

THERAPEUTISCHER EFFEKT REGULATORISCHER T-ZELLEN DES SPENDERS
IN DER GRAFT-VERSUS-HOST-ERKRANKUNG NACH ALLOGENER
STAMMZELLTRANSPLANTATION



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Biomedizinischen Wissenschaften
(Dr. rer. physiol.)

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Christin Riegel
aus
Göppingen

im Jahr
2017

THERAPEUTISCHER EFFEKT REGULATORISCHER T-ZELLEN DES SPENDERS
IN DER GRAFT-VERSUS-HOST-ERKRANKUNG NACH ALLOGENER
STAMMZELLTRANSPLANTATION



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Biomedizinischen Wissenschaften
(Dr. rer. physiol.)

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Christin Riegel
aus
Göppingen

im Jahr
2017

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

Betreuer: Prof. Dr. Matthias Edinger

Tag der mündlichen Prüfung: 24.10.17

Ich, Christin Riegel geboren am 16.01.01985 in Göppingen, erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, 04.09.2017

Abkürzungsverzeichnis

2-ME	2-Mercaptoethanol
Abb.	Abbildung
AMP	Adenosinmonophosphat
AMP	Antimikrobielle Peptide
AnoVa	<i>Analysis of Variance</i>
AP-1	Aktivator-Protein-1
APC	Antigen-präsentierende Zelle (<i>antigen presenting cell</i>)
APC	Allophycocyanin
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ATG	Antithymozyten Globulin
ATRA	All-trans-Retinsäure (<i>all-trans-retinoic acid</i>)
BLI	Biolumineszenzverfahren (<i>Bioluminescence imaging</i>)
Bzw.	Beziehungsweise
cAMP	Cytoplasmatisches zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	Cluster of differentiation
CFSE	Carboxy-Fluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester
CLP	Gemeinsamer lymphoider Vorläufer (<i>common lymphoid progenitor</i>)
cLP	Lamina propria des Colons
CMP	Gemeinsamer myeloider Vorläufer (<i>common myeloid progenitor</i>)
CSA	Cyclosporin A
CTL	Zytotoxische T-Zelle (<i>cytotoxic T cell</i>)
CTLA-4	Zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziierte Protein 4 (<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>)
Ct-Wert	<i>cycle threshold</i> -Wert
d	Tag
DAMP	Gefahr-assoziiertes molekulares Muster (<i>danger associated molecular pattern</i>)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DC	Dendritische Zelle (<i>dendritic cell</i>)
DEPC	Diethyldicarbonat
DP	Doppelt positiv
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
cDMEM	<i>Complete Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DN	Doppelt negativ
DNA	Desoxyribonukleinsäure
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure

DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i>
DTT	DL-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	Durchflusszytometrie (<i>fluorescence-activated cell sorting</i>)
FasL	Fas-Ligand
FCS	Fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FSC	„Vorwärts-Streulicht“ (<i>forward scatter</i>)
Foxp3	Forkhead Box Protein P3
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GI	Gastrointestinal
GMP	Gemeinsamer Vorläufer für Granulozyten und Makrophagen (<i>granulocyte/ macrophage progenitor</i>)
GMP	Gute Herstellungspraxis (<i>good manufacturing praxis</i>)
GVHD	„Spender-gegen-Empfänger“ Erkrankung (<i>graft-versus-host disease</i>)
aGVHD	akute „Spender-gegen-Empfänger“ Erkrankung
cGVHD	chronische „Spender-gegen-Empfänger“ Erkrankung
GVL-Effekt	„Spender-gegen-Leukämie“ Effekt (<i>graft-versus-leukemia</i>)
h	Stunde
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
H/E	Hämatoxylin/Eosin
HEV	<i>High endothelial venules</i>
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HPF	Blickfeld im Mikroskop (<i>high power field</i>)
HSZ	Hämatopoetische Stammzellen
HSZT	Hämatopoetische Stammzelltransplantation
ICER/CREM	<i>Inducible cAMP early repressor/cAMP response element modulator</i>
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IE	Intraepithelial
IEC	Intestinale Epithelzellen (<i>intestinal epithelial cells</i>)
IEL	Intraepitheliale Lymphozyten
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
ICH	Immunhistochemie
IL	Interleukin
ILC	<i>Innate lymphoid cells</i>

IPEX	Syndrom mit Immundysregulation, Polyendokrinopathie und Enteropathie
ITAM	Tyrosin-basierte Aktivierungsmotive (<i>tyrosine-based activation motifs</i>)
ITIM	Tyrosin-basierte Inhibierungsmotive (<i>tyrosine-based inhibition motifs</i>)
KM	Knochenmark
KMT	Knochenmarktransplantation
LAG-3	Lymphozyten-Aktivierungsgen-3 (<i>lymphocyte activation gene 3</i>)
Lin	Liniendefinierend (<i>lineage</i>)
LK	Lymphknoten
mLK	mesenteriale Lymphknoten
LP	Lamina propria
LPAM-1	<i>Lymphocyte Peyer patch adhesion molecule 1</i>
LPL	Lamina propria Leukozyten
Lsg	Lösung
LSK	Lin ⁻ Sca-1 ⁺ Kit ⁺
LT-HSZ	Langzeit (<i>long time</i>) hämatopoetische Stammzellen
LTi	<i>Lymphoid tissue inducer cells</i>
MACS	Magnetische Zellseparation (<i>magnetic cell separation</i>)
MAdCAM	<i>Mucosal addressin cell adhesion molecule</i>
MALT	Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe (<i>mucosa-associated lymphatic tissue</i>)
MDSZ	Myeloide Suppressorzelle
MEM-NEAA	MEM <i>Non-essential Amino Acid</i>
MEP	Gemeinsamer Vorläufer für Megakaryozyten und Erythrozyten (<i>megakaryocyte/ erythrocyte progenitor</i>)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
miHA	Minorantigen
min	Minute
MMF	Mycophenolat Mofetil
8-MOP	8-Methoxypsoralen
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MPP	Multipotente Vorläuferzellen (<i>multipotent progenitors</i>)
MTX	Methotrexat
MW	Mittelwert
NaOH	Natriumhydroxid
NFAT	Nukleärer Faktor aktivierter Zellen (<i>nuclear factor of activated cells</i>)
NF-κB	Nukleärer Faktor κB

NIH	<i>National Institute of Health</i>
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
n.s.	Nicht signifikant
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PAMP	Pathogen-assoziiertes molekulares Muster (<i>pathogen associated molecular pattern</i>)
PB	Peripheres Blut
PB	Pacific Blue
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin chlorophyll
PI	Propidiumiodid
PMA	Phorbol 12-myristat 13-acetat
PNAd	<i>Peripheral node addressin</i>
PP	Peyers Patches
PZ	Paneth-Zellen
Reg3-Proteine	<i>Regenerating islet-derived 3 –Proteine</i>
rhIL-2	Rekombinantes humanes Interleukin 2
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	<i>Messenger</i> Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SEM	Standardfehler (<i>standard error of the mean</i>)
SP	Einfach positiv (<i>single positive</i>)
SPF	Frei von spezifischen Pathogenen (<i>specific pathogen free</i>)
SPL	Milz (<i>spleen</i>)
SSC	„Seitwärts-Streulicht“ (<i>sideways scatter</i>)
ST-HSZ	Kurzzeit (<i>short time</i>) hämatopoetische Stammzellen
TCD	T-Zell-Depletion (<i>T cell depletion</i>)
TCR	T-Zell-Rezeptor (<i>T cell receptor</i>)
cTEC	Corticale Epithelzellen des Thymus (<i>cortical thymic epithelial cells</i>)
mTEC	Medulläre Epithelzellen des Thymus (<i>medullary thymic epithelial cells</i>)
T _{fh} -Zellen	Follikuläre T-Helferzellen
TGF-β	Transformierender Wachstumsfaktor β (<i>transforming growth factor β</i>)
T _H -Zelle	Helfer-T-Zelle
TIGIT	<i>T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains</i>
Tkonv-Zelle	Konventionelle T-Zelle

TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
Treg-Zelle	Regulatorische T-Zelle
iTreg	<i>In vitro</i> induzierte Treg-Zelle
pTreg	Periphere Treg-Zelle
tTreg	Thymusstämmige Treg-Zelle
Tresp	T-Responder-Zellen
TSDR	Treg-Zell spezifische demethylierte Region
UKR	Universitätsklinikum Regensburg
VE-Wasser	Vollentsalztes Wasser
Vs.	Versus
Z.B.	Zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	7
1.1	Die Hämatopoese.....	7
1.2	Die T-Zell-vermittelte Immunantwort.....	8
1.3	Immunologische Toleranz	10
1.3.1	Regulatorische T-Zellen	12
1.3.1.1	Der Transkriptionsfaktor Foxp3.....	13
1.3.1.2	Natürliche, thymusstämmige regulatorische T-Zellen (tTreg)	14
1.3.1.3	In der Peripherie induzierte regulatorische T-Zellen (pTreg)	15
1.3.1.4	<i>In vitro</i> induzierte regulatorische T-Zellen (iTreg).....	15
1.3.1.5	Tolerogene Foxp3-negative regulatorische T-Zellen.....	16
1.3.2	Mechanismen der Suppression von regulatorischen T-Zellen	16
1.3.2.1	Direkte Suppression von Tkonv	16
1.3.2.2	Indirekte (APC-vermittelte) Suppression	18
1.4	Hämatopoetische Stammzelltransplantation.....	19
1.5	Graft-versus-host disease (GVHD).....	21
1.5.1	Pathophysiologie der akuten GVHD	22
1.6	Der GI-Trakt als immunologisches System.....	23
1.7	Der GI-Trakt als Hauptzielorgan der GVHD.....	26
1.8	Therapie der aGVHD.....	27
1.9	Rolle der Treg in der aGVHD	27
2	Zielsetzung	29
3	Material und Methoden	30
3.1	Material	30
3.1.1	Chemikalien und Reagenzien.....	30
3.1.2	Medien, Puffer und Lösungen	32
3.1.3	Antikörper für die Durchflusszytometrie (FACS)	34
3.1.4	Kompensationsbeads.....	37
3.1.5	Primärantikörper für die Immunhistochemie	37

3.1.6	Sekundärantikörper für die Immunhistochemie.....	37
3.1.7	Magnetische Beads.....	37
3.1.8	Verbrauchsmaterialien	37
3.1.9	Geräte	38
3.1.10	Versuchstiere	39
3.1.11	Oligonukleotide	39
3.2	Methoden	40
3.2.1	Ermittlung der Lebendzellzahl	40
3.2.2	Aufarbeitung muriner Primärzellen	41
3.2.2.1	Venöse Blutentnahme	41
3.2.2.2	Isolation von Leukozyten aus dem Knochenmark	41
3.2.2.3	Isolation von Leukozyten aus der Milz	41
3.2.2.4	Isolation von Leukozyten aus Dick- und Dünndarm	42
3.2.2.5	Isolation von Leukozyten aus Lymphknoten und Peyers Patches.....	43
3.2.3	Magnetbasierte Zellanreicherung oder -depletion.....	43
3.2.3.1	Magnetbasierte Separation.....	43
3.2.3.2	Magnetbasierte Depletion.....	43
3.2.4	Durchflusszytometrische Messungen	44
3.2.4.1	Antikörperfärbung von Oberflächenmolekülen	45
3.2.4.2	Färbung von intrazellulären Molekülen	45
3.2.4.3	Identifikation von Leukozytenpopulationen	46
3.2.5	Isolation und Sortierung muriner regulatorischer und konventioneller T-Zellen für die <i>in vitro</i> Expansion	47
3.2.5.1	Magnetbasierte Zellanreicherung von murinen CD25 ⁺ Milzzellen	47
3.2.5.2	Zellsortierung von regulatorischen und konventionellen T-Zellen mittels Durchflusszytometrie.....	48
3.2.6	<i>In vitro</i> Methoden	48
3.2.6.1	Polyklonale Expansion von Treg- und Tkonv-Populationen	48
3.2.6.2	Suppressionsassay.....	49
3.2.6.3	PMA/Ionomycin-Stimulation für Zytokinanalysen	50

3.2.7	<i>In vivo</i> Methoden.....	50
3.2.7.1	Mauszucht und Haltung	50
3.2.7.2	Konditionierung und haploidente Knochenmarktransplantation.....	50
3.2.7.3	Bewertung der GVHD	51
3.2.8	Gewebefixierung und -färbung für die histopathologische Analyse.....	51
3.2.8.1	Einbetten und Schneiden von Organen	51
3.2.8.2	Hämatoxylin/Eosin Färbung.....	52
3.2.8.3	Immunhistochemische Färbungen	52
3.2.8.4	Histopathologie.....	53
3.2.9	Molekularbiologische Methoden	54
3.2.9.1	Isolation von RNA aus Gewebe	54
3.2.9.2	RNA-Gel	55
3.2.9.3	cDNA-Synthese durch reverse Transkription	55
3.2.9.4	Quantitative RT-Polymerase Kettenreaktion	56
3.2.9.4.1	Prinzip der Polymerase Kettenreaktion.....	56
3.2.9.4.2	Quantifizierung von RNA anhand des Protokolls der RT-PCR.....	56
3.2.10	Statistik	57
4	Ergebnisse.....	58
4.1	<i>In vitro</i> Expansion von CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg-Zellen	58
4.1.1	Anreicherung von Treg aus Primärzellen der Milz	58
4.1.2	Expansion und Phänotyp von CD62L ⁺ und CD62L ⁻ Treg-Zellen	60
4.1.3	Funktionelle Charakterisierung <i>in vitro</i> expandierter CD62L ⁺ Treg-Zellen.....	62
4.1.3.1	Immunsuppressive Aktivität nach <i>in vitro</i> Kultur	62
4.1.3.2	Zytokinprofil nach <i>in vitro</i> Kultur.....	63
4.1.4	Phänotypische Charakterisierung <i>in vitro</i> expandierter CD62L ⁺ Treg-Zellen.....	64
4.2	Isolation von Leukozyten aus gastrointestinalem Gewebe.....	67
4.2.1	Etablierung der Methode	67
4.2.2	Analyse gastrointestinaler Leukozyten aus unbehandelten Mäusen.....	69
4.3	Haploidente Knochenmarktransplantation und Treg-Therapie.....	73
4.3.1	Transplantationsschema	73

4.3.2	Manifestation einer aGVHD mit starker Darmbeteiligung im haploidenten KMT-Modell an d11 nach Transplantation	73
4.3.3	Therapie einer bestehenden aGVHD durch adoptiven Transfer <i>in vitro</i> expandierter Spender Treg-Zellen	82
4.3.4	Das Ansprechen auf die Treg-Therapie ist unabhängig vom initialen Schweregrad der aGVHD.....	85
4.3.5	Migration, Persistenz und Stabilität therapeutisch applizierter Spender-Treg-Zellen	86
4.3.6	Verbesserte hämatopoietische Rekonstitution nach Treg-Therapie.....	90
4.3.7	Therapeutische Treg unterstützen die Regeneration des Gastrointestinaltraktes und dämpfen die Inflammation im Colon.....	97
4.3.8	Verbesserter Therapieerfolg nach wiederholter Verabreichung therapeutischer Treg	108
5	Diskussion	113
6	Zusammenfassung und Ausblick	127
7	Anhang.....	130
7.1	Abbildungsverzeichnis.....	130
7.2	Tabellenverzeichnis.....	132
8	Literaturverzeichnis	134
9	Danksagung	155
10	Lebenslauf	157

1 Einleitung

1.1 Die Hämatopoese

Alle zellulären Bestandteile des Blutes (Erythrozyten, Thrombozyten, myeloische Zellen und Lymphozyten) entstehen postnatal aus hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) im Knochenmark (KM). Diese besitzen die Fähigkeit, sich selbst zu replizieren (Selbsterneuerungspotential) und können in jeglichen Zelltyp des hämatologischen Systems differenzieren (Multi-liniendifferenzierungspotential).

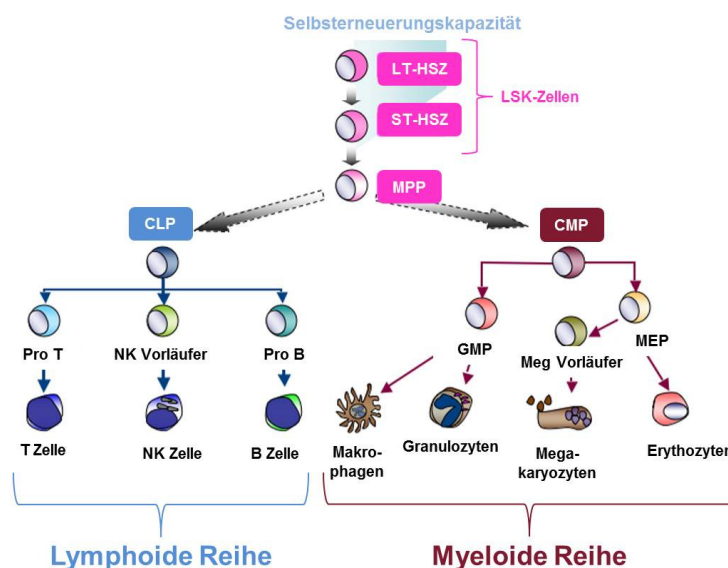


Abb. 1.1: Stadien der Hämatopoese, modifiziert nach Lai und Kondo (1).

Die Differenzierung hämatopoetischer Zellen aus HSZ erfolgt stufenweise (siehe Abb. 1.1) und führt zu einem zunehmenden Verlust des Selbsterneuerungspotentials der Vorläuferzellen. Als undifferenzierte Zellen der Hämatopoese exprimieren HSZ keine Linien-differenzierenden Oberflächenmarker und werden deshalb durch das Fehlen dieser sogenannter "lineage-marker" (lin) und anhand der Expression hoher Mengen des Stammzellantigens 1 (*stem-cell antigen 1*, sca-1) sowie Kit identifiziert. Diese sogenannten LSK-Zellen (Lin⁻Sca-1⁺Kit⁺) werden unterteilt in Langzeit-HSZ (CD34⁻), die die Kapazität zur Langzeitrepopulation in immundefizienten Mäusen haben, und Kurzzeit-HSZ (CD34⁺) mit limitierter Selbsterneuerungsfähigkeit und deshalb nur passagerer Repopulationskapazität. Diese HSZ differenzieren zu multipotenten Vorläuferzellen (*multipotent progenitors*, MPP), aus welchen sich liniendeterminierte Vorläufer für die lymphatische (gemeinsamer lymphoider Vorläufer; CLP, *common lymphoid progenitor*) und die myeloische Reihe (gemeinsamer myeloider Vorläufer; CMP, *common myeloid progenitor*) rekrutieren. Mit dieser fortschreitenden Differenzierung nimmt das Potential zur Multilinien-Differenzierung der Vorläuferzellen ab. Aus den CLP entstehen über weitere Zwischenstufen ausschließlich T-, NK- und B-Zellen, aus den CMP

gemeinsame Vorläufer für Granulozyten und Makrophagen (GMP, *granulocyte/ macrophage progenitor*) sowie ein gemeinsamer Vorläufer für Megakaryozyten und Erythrozyten (MEP, *megakaryocyte/ erythrocyte progenitor*), aus denen sich jeweils die reifen Blutzellelemente entwickeln (1, 2).

1.2 Die T-Zell-vermittelte Immunantwort

Das T-Zellkompartiment ist von zentraler Bedeutung für die Initiierung und Regulation adaptiver Immunreaktionen zur gezielten Bekämpfung von Pathogenen und der Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses. Hierbei interagieren naive T-Zellen mit Antigen-präsentierenden Zellen (APC, *antigen presenting cells*) in sekundär lymphatischen Organen, wodurch nach klonaler Expansion und Differenzierung sowohl Effektor-T-Zellen als auch Gedächtnis-T-Zellen entstehen (3, 4). Die Antigenerkennung wird durch die Bindung des T-Zell-Rezeptors (*T cell receptor*, TCR) an die Peptidbindungstasche der sogenannten Haupt-histokompatibilitätskomplexe vermittelt (MHC, *major histocompatibility complex* in der Maus; HLA [humane Leukozytenantigene] beim Menschen) (5). Es werden zwei MHC-Klassen unterschieden, die unterschiedlichen T-Lymphozyten zur Antigenerkennung dienen. CD8⁺ zytotoxische T-Zellen (CTL, *cytotoxic T cell*) sind MHC-I restringiert, während CD4⁺ Helfer T-Zellen (T_H-Zellen) Antigene auf MHC Klasse II Molekülen erkennen. MHC-Klasse I Moleküle befinden sich auf allen kernhaltigen Zellen und dienen der Präsentation intrazellulär prozessierter Proteine (3, 6). Sie bestehen aus einer polymorphen, im MHC-Lokus kodierten α -Kette (schwere Kette), die nicht kovalent an eine nicht-polymorphe β -Kette (β_2 -Mikroglobulin, leichte Kette) gebunden ist. Es gibt drei klassische Genloci für die α -Kette des MHC-Klasse I Moleküls, die beim Menschen als HLA-A, -B und -C und bei Mäusen als H-2K, D, und L bezeichnet werden. Die amino-terminalen α_1 - und α_2 -Segmente der α -Kette bilden die an beiden Enden geschlossene Peptidbindungstasche, in der Peptide mit einer Länge von 8-11 Aminosäuren gebunden werden (7). Die Aminosäuresequenz des α_3 Segments ist einheitlich für alle Klasse I Moleküle und enthält die Bindungsstelle für den CD8-Korezeptor der T-Lymphozyten (3). Das Carboxyl-terminale Ende der α -Kette ist in der Membran verankert. MHC-Klasse II Moleküle werden hauptsächlich auf der Oberfläche von APCs exprimiert und präsentieren präferentiell prozessierte Peptide extrazellulärer Proteine und Erreger, die durch Endozytose aufgenommen wurden. Bestimmte APCs sind in der Lage exogene Antigene auch auf MHC-Klasse I Molekülen zu präsentieren (Kreuzpräsentation), wodurch eine Immunantwort auch gegen Mikroorganismen induziert werden kann, die APCs selbst nicht infizieren (8). Die klassischen MHC-Klasse II Gene werden beim Menschen als HLA-DR, -DP und -DQ und bei der Maus als I-A und I-E bezeichnet (9). MHC der Klasse II bestehen aus zwei nicht-kovalent gebundenen polymorphen Polypeptidketten, einer α - und einer β -Kette, deren amino-terminale Enden (α_1 - und β_1 -Segment) interagieren und damit die

Peptidbindungstasche formen. Diese ist im Gegensatz zu MHC der Klasse I an beiden Seiten geöffnet, sodass Peptide mit einer größeren Aminosäurelänge (12-20) gebunden werden (6). Die α_2 - und β_2 -Segmente des MHC Klasse II sind nicht polymorph und konserviert über alle MHC Klasse II Moleküle, wobei das β_2 -Segment die Bindungsstelle für den CD4-Korezeptor der T_H -Zellen trägt. Auch hier sind die Carboxyl-terminalen Enden beider Ketten in der Membran verankert (3, 4).

Der TCR auf T-Lymphozyten ist ein in der Membran verankertes Molekül, bestehend aus α/β oder γ/δ Heterodimeren mit je einer variablen und einer konstanten Domäne, die im Komplex mit den CD3-Heterodimeren ϵ/δ und γ/ϵ und dem CD3-Homodimer ζ/ζ in die Zellmembran eingelagert sind. Bei Bindung des TCR an den MHC-Peptid-Komplex, bildet sich eine immunologische Synapse zwischen dem T-Lymphozyt und der APC aus. Im Rahmen dieser Synapsenformation kommt es zu einer Verlinkung des TCR und der Transmembrandomänen der CD3 Moleküle, was zur zytoplasmatischen Phosphorylierung von Tyrosin-basierten Aktivierungsmotiven, sogenannten ITAMS (*tyrosine-based activation motifs*), führt, deren intrazelluläre Signalkaskade schließlich die transkriptionelle Aktivierung von Genen für die Proliferation und Differenzierung von T-Zellen induziert. Hierfür bedarf es außerdem kostimulatorischer Signale der Rezeptoren CD28 und CD2, da T-Lymphozyten andernfalls anerg werden oder sogar in Apoptose gehen (4, 10).

Die Effektorfunktion aktivierter T-Lymphozyten unterscheidet sich je nach Subtyp. $CD8^+$ CTL erkennen infizierte körpereigene Zellen durch deren Antigenpräsentation auf MHC-I und induzieren Zelltod durch Perforin-vermittelte Porenbildung in die Zielzellmembran und den Transfer von Granzymen, wodurch eine Apoptose-induzierende proteolytische Enzymkaskade aktiviert wird. Alternativ kann der von CTL exprimierte Fas-Ligand an das Fas-Molekül der Zielzelle binden, wodurch in der Zielzelle Apoptose-induzierende Caspasen aktiviert werden (4, 11). Unter den $CD4^+$ T-Helferzellen werden diverse Effektorsubtypen unterschieden, die hauptsächlich durch ihr differentielles Zytokinprofil charakterisiert sind und als T_H1 , T_H2 , T_H17 , T_H9 , T_H22 und folliculäre T-Helferzellen (T_{FH}) bezeichnet werden. Die jeweilige Differenzierung der unterschiedlichen T_H -Subtypen aus naiven $CD4^+$ T-Zellen erfolgt unter dem Einfluss des Mikromilieus und Zytokinen im Rahmen der TCR-Stimulation. Interleukin (IL-)12 induziert hierbei präferentiell die Bildung von T_H1 -Zellen, welche die pro-inflammatorischen Zytokine IL-2, Tumornekrosefaktor (TNF) und Interferon (IFN- γ) sezernieren und zelluläre Immunantworten fördern. Aufgrund ihrer pro-inflammatorischen Aktivität, z.B. durch Bildung und Sekretion von IFN- γ , wird T_H1 -Zellen auch eine Rolle in der Pathogenese von Autoimmunkrankheiten wie dem Typ I Diabetes oder der multiplen Sklerose zugesprochen (12). T_H2 -Zellen werden präferentiell durch IL-4 induziert und sezernieren dann IL-4, IL-5 und IL-13, wodurch sie insbesondere humorale Immunantworten fördern (13, 14). T_H17 -Zellen

werden nach Stimulation mit IL-23 induziert und sezernieren ihrerseits IL-17, dessen pro-inflammatorischen Effekte unter anderem die Migration von Neutrophilen und Makrophagen erhöht und die Proliferation diverser T-Zell-Subtypen anregt (15). T_H17 -Zellen wird insbesondere eine Bedeutung für die Abwehr extrazellulärer Erreger zugeschrieben (12). T_H9 -Zellen produzieren IL-9, das in Zusammenhang mit Mast- und T-Zell-Proliferation steht und in B-Zellen einen Klassenwechsel zu IgE begünstigt. IL-9 wirkt zudem auch auf nicht-hämatopoetische Zellen, darunter Epithelzellen der Lunge und des Darmes, wo es die Schleimbildung epithelialer Zellen in der Lunge erhöht und die Barrierefunktion des Darmepithels steigert (16). Im Menschen wurden sogenannte T_H22 -Zellen beschrieben, die IL-22 aber nicht IL-17, IL-4 oder IFN- γ produzieren. Ob es sich hierbei um einen eigenständigen T-Helfer-Subtyp handelt ist bisher noch strittig, da in experimentellen Modellen noch kein T_H -Subtyp identifiziert wurde, der exklusiv IL-22 sezerniert (12). T_{FH} -Zellen werden durch ihre Lage im B-Zell-Follikel und durch die Expression des CXC Chemokin-Rezeptors 5 (CXCR5) charakterisiert. Sie sind essentiell für die Bildung der Keimzentren und unterstützen damit die B-Zell-Reifung und Antikörper-Produktion für die humorale Immunabwehr (12).

1.3 Immunologische Toleranz

Die Entwicklung eines adaptiven Immunsystems birgt das Risiko von Autoimmunität. Die Unterscheidungsfähigkeit von "selbst" versus "fremd" wird vor allem durch die Positiv- und Negativselektion im Rahmen der thymischen T-Zell-Entwicklung gewährleistet und diese zentralen Toleranzmechanismen werden durch periphere Toleranzmechanismen ergänzt.

Zentrale Toleranz: Die zentrale Immuntoleranz findet im Thymus während der T-Zell-Entwicklung statt, wo unreife Thymozyten in Cortex und Medulla mehrere Phasen der T-Zell-Reifung durchlaufen (siehe Abb. 1.2).

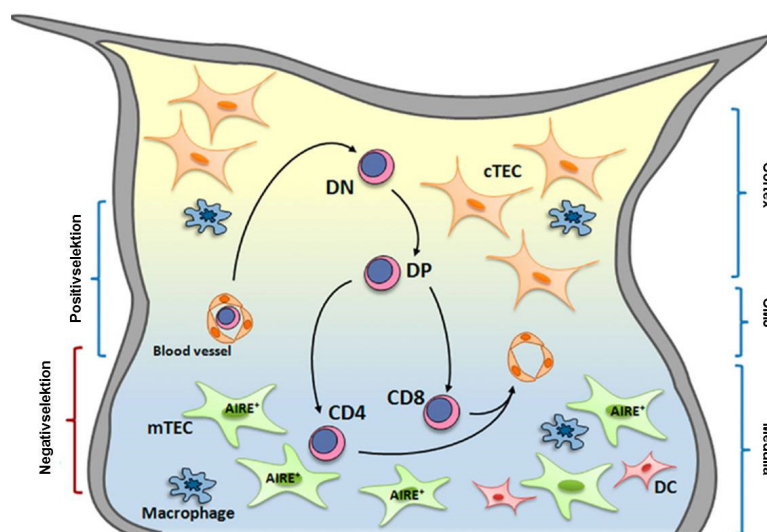


Abb. 1.2: Zentrale Toleranz im Thymus, modifiziert nach Passos et al. (17)

Knochenmarkstammige Vorläuferzellen wandern unter Einfluss des Chemokins CCL21, das an den Chemokinrezeptor CCR7 bindet, aus dem Blut in das Gewebe des Thymus ein. Die doppelt-negativen ($CD4^-/CD8^-$, DN) Thymozyten beginnen in der Cortexregion des Thymus sowohl den $CD4^-$ als auch den $CD8^-$ -Korezeptor zu exprimieren, wodurch sie zu doppelt-positiven ($CD4^+/CD8^+$, DP) Thymozyten werden. In diesem Stadium beginnt die DP-Zelle einen TCR zu generieren und auf ihrer Oberfläche zu exprimieren. Die corticalen Epithelzellen des Thymus (*cortical thymic epithelial cells*, cTEC) präsentieren den DP-Thymozyten Selbst-Peptide über ihren MHC. Erkennt der TCR des DP-Thymozyten diesen MHC:Peptid-Komplex bekommt die DP-Zelle ein Überlebenssignal. Dieser Prozess, der die MHC-Bindungskapazität des TCR sicherstellt, wird als Positivselektion bezeichnet. DP-Thymozyten mit einem TCR, der körpereigenes MHC mit Selbst-Peptiden nicht oder nur mit geringer Avidität erkennt, bekommen keine Überlebenssignale durch die cTEC und sterben aufgrund des sogenannten „*death by neglect*“. Positiv selektionierte DP-Thymozyten wandern in die Medulla des Thymus, wo sie mit dessen Epithelzellen (*medullary thymic epithelial cells*, mTEC) interagieren. Diese *Aire* (*auto-immune regulator*)-exprimierenden mTEC präsentieren auf ihrem MHC eine große Vielfalt an peripheren, körpereigenen Gewebeantigenen. Thymozyten, deren TCR diese Selbst-Peptide mit einer hohen Affinität und Avidität erkennen und dadurch aktiviert werden, werden durch die Induktion von Apoptose aussortiert. Dieser Prozess wird Negativselektion genannt und dient der klonalen Deletion selbst-reaktiver T-Zellen vor Entlassung in die Peripherie, wo sie potentiell Autoimmunität auslösen könnten. Nur Thymozyten, deren TCR mit niedriger oder mittlerer Avidität für den MHC:Selbst-Peptid-Komplex reagieren überleben und schließen den Reifungsprozess ab. Über den TCR und den $CD4/CD8$ -Korezeptor werden schließlich Signale generiert, die zur Herunterregulation eines der beiden Korezeptoren und zur abschließenden Ausreifung in einzelpositive (*single positive*, SP) $CD4^+$ oder $CD8^+$ T-Zellen führen (17). Diese zentralen Toleranzprozesse verhindern daher die Entlassung selbst-reaktiver T-Zellen aus dem Thymus und stellen gleichzeitig sicher, dass periphere T-Zellen mit Selbst-MHC interagieren können.

Periphere Toleranzmechanismen: Die zentralen Toleranzmechanismen sind lückenhaft und selbst bei Gesunden können regelmäßig potentiell autoreaktive T-Zellen in der Peripherie nachgewiesen werden. Für die Kontrolle solcher Autoimmunreaktionen tragen periphere Toleranzmechanismen bei, die in rezessive, zell-intrinsische und dominante, zell-extrinsische Mechanismen unterschieden werden. Zu den zell-intrinsischen Mechanismen zählen z.B. die klonale Deletion (durch Apoptose) autoreaktiver T-Zellen in der Peripherie nach Antigenkontakt sowie die Induktion von Anergie durch TCR-Stimulation in Abwesenheit von Kostimulationssignalen. Hierbei werden T-Zellen funktionell inaktiviert, zum Beispiel durch Induktion von ITIMS (*tyrosine-based inhibition motifs*), was zu einer starken Erhöhung ihrer Aktivierungsschwelle führt. Der dominante zell-extrinsische periphere Immunregulationsmecha-

nismus beinhaltet hauptsächlich die Suppression autoreaktiver T-Zellen durch regulatorische T-Zellen (Treg). Diese inhibieren "in-trans" die Aktivierung und Expansion von T-Lymphozyten und wirken auch auf andere Zellen des adaptiven und angeborenen Immunsystems, wie z.B. dendritische Zellen. Jede Aktivierung des adaptiven Immunsystems führt nicht nur zur Expansion und Differenzierung von antigenspezifischen T- und B-Lymphozyten, sondern auch von Treg, sodass eine Homöostase zwischen Immunität und Schutz vor inflammationsbedingtem Schaden an körpereigenen Zellen entsteht (18, 19).

1.3.1 Regulatorische T-Zellen

Regulatorische T-Zellen sind eine spezialisierte Untergruppe der CD4⁺ T-Lymphozyten, die zur Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz beitragen, indem sie die Aktivierung und Expansion autoreaktiver Zellen unterdrücken und darüber hinaus in der Lage sind, eine überschießende Immunantwort gegen pathogene Antigene in Grenzen zu halten. Es werden anhand ihrer Entstehung drei verschiedene Gruppen von Treg unterschieden. Treg, die direkt im Thymus während der T-Zell-Reifung entstehen, werden als "natürliche" oder "thymusstämmige" Treg (tTreg) bezeichnet. Die zweite Gruppe der Treg entsteht in peripheren Organen (pTreg) aus reifen CD4⁺ T_H-Zellen unter tolerogenen Bedingungen. Daneben gibt es noch eine weitere Untergruppe der Treg (iTreg), die ebenfalls aus CD4⁺ T_H-Zellen entsteht, deren Induktion jedoch üblicherweise *in vitro* durch Zugabe des transformierenden Wachstumsfaktors β (*transforming growth factor* β , TGF- β) erfolgt (20). Neben diesen CD4⁺ Treg-Zellen werden mittlerweile noch weiteren Zelltypen regulatorische Funktionen zugeschrieben, darunter CD8⁺CD28⁻ iTreg-Zellen, die durch wiederholte Antigenstimulation in Gegenwart von TGF- β entstehen (21). Darüber hinaus gibt es regulatorische Subpopulationen unter den natürlichen Killer-T-Zellen (22), den CD4⁻/CD8⁻ doppelt negativen (DN) T-Zellen (23) und den $\gamma\delta$ T-Zellen (24).

Das Fehlen definierter Immunphänotypen hat die Untersuchung von Treg lange Zeit erschwert. Funktionell konnten aber deutliche Hinweise auf die Bedeutung peripherer Suppression für die Immunhomöostase nachgewiesen werden. Erste Anzeichen für einen suppressiven Immunzelltypus gab es nach experimentellen Studien, in denen neonatal der Thymus entfernt wurde. Geschah dies im kritischen Zeitpunkt der ersten drei Tage nach Geburt, hatte dies organspezifische Autoimmunerkrankungen und überschießende Inflammation zur Folge, die mit dem Auftreten gewebespezifischer Autoantikörper in der Zirkulation einhergingen. So führte eine Thymektomie in adulten Ratten nach subletalen Bestrahlungsrounden zur autoimmunen Thyreoiditis und Typ I Diabetes, was durch Transfusion von CD4⁺ T-Zellen oder CD4⁺CD8⁻ Thymozyten aus unbehandelten syngen Tieren verhindert werden konnte (25, 26). Diese Ergebnisse zeigten, dass autoreaktive T-Zellen prinzipiell auch bei Gesunden vorkommen und dass eine Untergruppe an CD4⁺ T-Zellen diese unterdrücken kann. Im

weiteren Verlauf konnte die Arbeitsgruppe um Shimon Sakaguchi in ihrer bahnbrechenden Arbeit nachweisen, dass die Autoimmunphänomene nach neonataler Thymektomie in Mäusen durch den adoptiven Transfer von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen komplett verhindert werden kann. Genauso verhinderten CD4⁺CD25⁺ T-Zellen die Autoimmunität, die nach Transfer von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen in T-Zell-defizienten Empfängertieren auftritt (27). Hierdurch wurde erstmals ein Phänotyp für diese potente Suppressorzellpopulation definiert, die sich durch ihre konstitutive Expression der α -Kette des IL-2-Rezeptors (CD25) auszeichnet. Die Koexpression von CD4⁺ und CD25⁺ ist allerdings nicht Treg-spezifisch, da CD25 nach Aktivierung auch auf konventionellen T-Helfer-Zellen (Tkonv) hochreguliert wird. Erst mit der Entdeckung der Treg-spezifischen Expression des *foxp3*-Gens wurde der Phänotyp besser eingrenzbar und die funktionelle Relevanz peripherer Suppression definitiv bewiesen. So liegt z.B. dem Autoimmunphänotyp der sogenannten *scurfy* Maus eine Funktionsverlustmutation im *foxp3*-Gen zugrunde (28, 29). Auch im Menschen führen Mutationen im *foxp3*-Gen zum Funktionsverlust von Treg und schweren, oft letalen, Autoimmunerkrankungen, namentlich zum X-chromosomal vererbten Immundysregulations-, Polyendokrinopathie und Enteropathie-Syndrom (IPEX), welches ohne Knochenmarktransplantation (KMT) meist bereits im Kleinkindalter letal verläuft (30). Foxp3 ist der intranukleäre Transkriptionsfaktor Forkhead Box Protein P3 (Foxp3), der für die suppressive Funktion von Treg-Zellen essentiell ist und diese T-Zelllinie definiert (29, 31).

1.3.1.1 Der Transkriptionsfaktor Foxp3

Der Transkriptionsfaktor Foxp3 ist ein 47-kDa großes Protein bestehend aus 431 Aminosäuren. Es gehört zur Unterfamilie P der Fox Proteinfamilie, die eine präservierte DNA-Bindungsdomäne aufweist, die wie eine Gabel (*forkhead*) geschwungen ist und sich am C-terminalen Ende des Proteins befindet. In der zentralen Domäne des Proteins befinden sich außerdem die C2H2 Zink-Finger (ZnF) und Leuzin-Zipper (LeuZip) Regionen, am N-terminalen Ende eine Repressor-Domäne (20). Diese Domäne interagiert mit Aktivator-Protein-1 (AP-1), blockiert die Aktivität des AP-1/NFAT-Komplexes (*nuclear factor of activated cells*, NFAT) und beeinflusst so weitere Signalkaskaden (32). Das *foxp3*-Gen umfasst 11 Exons und befindet sich auf dem kurzen Arm des X-Chromosoms auf Position Xp11.23. Die funktionelle Relevanz der Foxp3-Expression für die Treg-Funktion wurde in Nachfolgestudien bestätigt: Durch retroviralen Transfer von Foxp3 in CD4⁺CD25⁻ T-Zellen konvertierten diese zu einem regulatorischen Phänotyp indem sie CD25, zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziierte Protein 4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*, CTLA-4) und CD137 hochregulierten und ähnlich wie tTreg nach Stimulation nur marginale Mengen an IL-2, IL-4 und IFN- γ sezernierten (31). Diese Daten wiesen auf die duale Rolle von Foxp3 als transkriptionaler Repressor und Aktivator hin. Als Repressor interagiert Foxp3 mit dem Transkriptionsfaktor NFAT und dem nukleären Faktor κ B (*nuclear factor κ B*, NF- κ B) und blockiert damit die Expression Zytokin-

kodierender Gene (33). Die Acetylierung von Foxp3 durch Tip60-Histon-Acetyltransferase und verschiedener Klasse I und II Histon-Deacetylasen verstärkt die Bindung des Foxp3 an den *Il2*-Promotor und damit die Repression des *Il2*-Gens. Biochemische Analysen zeigten darüber hinaus, dass der transkriptionelle Komplex von Foxp3 mehr als 300 assoziierte Proteine als Kofaktoren beinhaltet, der unter anderem durch Umstrukturierung des Chromatins mittels Histon-Acetylierung und Deacetylierung zahlreiche Foxp3-Zielgene reguliert (20). Insgesamt kontrolliert Foxp3 direkt oder indirekt die Expression von etwa 700 Genen, bindet aber nur an ca. 70 direkt. Darunter fallen Gene zur Signaltransduktion (Zap70, Ptpn22), Transkriptionsfaktoren (Crem), Zytokine (IL-2, IL-4, IFN- γ), Oberflächenmoleküle (CD25, CTLA-4, FasL), Enzyme des Zellmetabolismus und intergenetische Mikro-RNA (miR-155). Die funktionelle Aktivität und Linienstabilität von Treg wird u.a. durch epigenetische Modifikationen gewährleistet (34). Im *foxp3*-Lokus wurden drei konservierte nicht-kodierende Regionen beschrieben, die epigenetischen Modifikationen unterliegen und die Transkription des Foxp3-Proteins regulieren. Diese Regionen entsprechen dem Foxp3-Promotor, einem „Sensor“ für Signale durch TGF- β , der als *Enhancer* fungiert und der Treg-Zell spezifischen demethylierten Region (TSDR), die sowohl als *Enhancer* als auch als Stabilisator der Foxp3-Expression wirkt. Der Foxp3-Promotor wird nach TCR-Signal durch Bindung von NFAT und AP-1 aktiviert. Treg- und Tkonv-Zellen weisen in der epigenetischen Modifikation des Foxp3-Promotors in sowohl Mensch als auch Maus Unterschiede auf. Die CpG-Motive im Foxp3-Promotor von Treg sind komplett demethyliert, wohingegen diese in ruhenden Tkonv schwach und in aktivierten Tkonv stark methyliert sind. Darüber hinaus ist der Foxp3-Promotor in Treg stärker mit acetylierten Histonen assoziiert, was ebenfalls auf eine höhere Zugänglichkeit des Promotors in Treg schließen lässt (35). Eine zweite CpG-reiche Region des *foxp3*-Lokus wurde als "*Treg-specific demethylated region*" (TSDR) beschrieben und liegt in tTreg-Zellen vollständig demethyliert vor (mit begleitender Akkumulation acetylierter Histone H3 und H4), während sie in Tkonv-Zellen komplett methyliert ist. Die TSDR wirkt als Enhancer und ihr Methylierungsstatus bestimmt die Stabilität der Foxp3-Expression, da nur Zellen mit demethylierter TSDR eine dauerhafte Foxp3-Expression aufweisen (35). Die dritte spezieübergreifend konservierte CpG-Region ist ein TGF- β -Sensor mit Bindungsstellen für NFAT und SMADs, die intrazellulären Signalproteine von TGF-Liganden. In allen, auch transient Foxp3-exprimierenden Zellen, ist diese Region durch den erhöhten Level an acetyliertem Histon H4 zugänglich (35).

1.3.1.2 Natürliche, thymusstämmige regulatorische T-Zellen (tTreg)

Die CD4⁺CD25⁺ tTreg Zellen werden im Thymus nach der TCR-Rekombination aus CD4 SP-Zellen gebildet, wobei die Intensität der TCR-Stimulation für die Induktion der Foxp3 Expression entscheidend zu sein scheint (36, 37) und die epigenetische Treg-Signatur von der Dauer der TCR-Stimulation abhängt (38). Nur wenn eine erhöhte Avidität vorliegt und eine

ausreichend lange TCR-Stimulation im Thymus erfolgt, kommt es zur terminalen Differenzierung in tTreg-Zellen mit stabiler Foxp3-Expression und vollständiger Demethylierung des Foxp3-Promotors und der TSDR (34). In der Peripherie repräsentieren tTreg ca. 5-10 % der CD4⁺ T-Zellen im Blut von Säugetieren und im Menschen (27, 39). Neben der Expression von CD25 und Foxp3 werden Neuropilin und Helios als charakteristische Marker für tTreg diskutiert, die eine Unterscheidung zu pTreg und iTreg ermöglichen (40). Ursprünglich wurden tTreg als anerge Zellpopulation beschrieben, da sie im Unterschied zu Tkonv nach TCR-Stimulation *in vitro* nicht proliferieren (41, 42). Diese Anergie kann allerdings mittels Kostimulation und IL-2 Supplementierung aufgehoben werden. Da tTreg selbst kein IL-2 produzieren, sind sie auf exogenes IL-2 angewiesen (43). IL-2 ist essentiell für das Überleben und die Funktion von Treg, da es die Foxp3 mRNA-Expression induziert und stabilisiert. Darüber hinaus erhöht es die Expression anti-apoptotischer Proteine und inhibiert pro-apoptotische Proteine wie Bim (20). *In vivo* erscheinen tTreg nicht anerg zu sein, da ein gewisser Anteil kontinuierlich proliferiert, was auf die Erkennung von Selbst-Antigenen und kommensale Bakterien zurückgeführt wird (44, 45). Thymusstämmige Treg können also unter geeigneten Bedingungen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* unter Beibehaltung ihres Phänotyps und ihrer Funktion klonal expandieren (46, 47).

1.3.1.3 In der Peripherie induzierte regulatorische T-Zellen (pTreg)

In der Peripherie induzierte pTreg entstehen *de novo* aus CD4⁺CD25⁻ Tkonv durch kontinuierliche subimmunogene Stimulation mit bestimmten Peptiden, zum Beispiel Peptiden von Nahrungsmitteln oder kommensalen Darmbakterien (48). In *in vivo* Modellen überlebten diese pTreg nach einmaliger Induktion ohne Restimulation für ca. 9 Wochen ohne weitere Stimulation mit ihrem spezifischen Antigen und behielten ihren suppressiven Foxp3-Phänotyp auch unter inflammatorischen Bedingungen *in vivo* bei (48). Diese Stabilität sprach für eine Demethylierung des TSDR und konnte in Nachfolgeexperimenten von Polansky et al auch bestätigt werden (49). Im Gegensatz zu tTreg exprimieren pTreg und iTreg jedoch in geringerem Maße Helios sowie den Oberflächenmarker Neuropilin (40).

1.3.1.4 In vitro induzierte regulatorische T-Zellen (iTreg)

In vitro können Treg durch eine Vielzahl an Zusätzen generiert werden und fallen dann unter die Terminologie iTreg. Spezifische Antigen-Stimulation naiver CD4⁺ Tkonv unter Zugabe von TGF- β führt zur Expression von Foxp3 (50, 51). Im Gegensatz zu tTreg und pTreg findet hier jedoch keine Demethylierung der TSDR, sondern nur der TGF- β -Sensor-Region und des Promotors im *foxp3*-Gen statt (35), wodurch die Zellen phänotypisch instabil sind und unter inflammatorischen Einflüssen *in vivo* die Foxp3-Expression und damit ihre immunsuppressiven Eigenschaften verlieren (49, 52).

1.3.1.5 Tolerogene Foxp3-negative regulatorische T-Zellen

Neben Foxp3-exprimierenden Treg wurde eine Vielzahl an Foxp3-negativen CD4⁺ T-Zellen mit regulatorischer Funktion beschrieben. *In vivo* und *in vitro* können CD4⁺ T-Zellen durch langanhaltende Antigenstimulation unter IL-10-Einfluß in den sogenannten regulatorischen Tr1-Typ differenzieren. Diese sind in der Lage, TGF- β und IL-10 auszuschütten, haben aber kein rein anti-inflammatorisches Zytokinprofil, da sie auch IFN- γ sowie IL-5 produzieren (53, 54). Tr1-Zellen sollen zellkontaktunabhängig die Aktivierung von naiven und Gedächtnis-T-Zellen supprimieren und sowohl T_H1- als auch T_H2-Immunantworten verhindern (50, 55). Eine weitere Subpopulation Foxp3⁻ pTreg wird durch Kontakt mit Nahrungsmittelantigenen im Gastrointestinaltrakt (GI-Trakt) generiert. Diese Zellen werden als T-Helfer-Typ 3 (T_H3) Zellen bezeichnet und sezernieren große Mengen an TGF- β und nur in geringem Maße IL-10 und IL-4. Diese Zellen können ebenfalls T_H1- und T_H2-Antworten modulieren und führen in B-Zellen zum Switch von Immunglobulin (Ig)M zu IgA. Dadurch sind sie ein wichtiger Bestandteil des mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebes (*mucosa-associated lymphatic tissue*, MALT) des Darmes (56). Die Induktion von T_H3-Zellen wird darüber hinaus auch durch All-trans-Retinsäure herbeigeführt. Diese wird durch Subpopulationen dendritischer Zellen im MALT produziert, inhibiert die IL-6 getriebene Differenzierung in T_H17-Zellen und unterstützt die TGF- β getriebene Induktion naiver T-Zellen in Foxp3⁺ pTreg (57-59).

1.3.2 Mechanismen der Suppression von regulatorischen T-Zellen

Die antigenspezifische Aktivierung naiver Treg im Lymphknoten benötigt etwa eine 10-100-fach geringere Menge an Antigen im Vergleich zu naiven Tkonv derselben Antigenspezifität. Sie können daher selbst von unreifen APCs aktiviert werden, deren Expressionslevel an Selbst-Peptid:MHC zu gering ist um eine naive selbst-reaktive Tkonv-Zelle zu aktivieren (60). Antigen-spezifisch aktivierte Treg sind unter anderem in der Lage, die Differenzierung und Funktion von CD4⁺ und CD8⁺ T-Effektorzellen (41, 43), natürlichen Killer- (NK-) und natürlichen Killer-T- (NKT-) Zellen (61), B-Lymphozyten (61), Makrophagen, Osteoklasten sowie dendritischen Zellen (*dendritic cells*, DC) (62) zu supprimieren. Mittlerweile wurden zahlreiche Mechanismen der Treg-vermittelten Immunsuppression beschrieben, die wahrscheinlich in Abhängigkeit vom experimentellen Modell und den Umgebungsbedingungen variabel zum Einsatz kommen. Es werden zwei grundlegende Wirkungsweisen unterschieden: (1) direkte Wirkung auf Tkonv durch Zytokine oder direkten Zellkontakt sowie (2) indirekte Wirkungen durch Einfluss auf Reifung und Funktion von DCs.

1.3.2.1 Direkte Suppression von Tkonv

Treg supprimieren die Aktivierung, Proliferation und Zytokinsekretion von Tkonv. In initialen Versuchen wurde gezeigt, dass diese Suppression direkt zwischen Treg und Tkonv stattfinden

kann und keine APCs benötigt werden (63). Wurden Treg- und Tkonv-Zellen jedoch durch eine semipermeable Membran voneinander getrennt, war keine Suppression zu beobachten. Der direkte Zellkontakt inhibierte die durch die TCR-Aktivierung induzierte Proliferation von Tkonv sowie deren Transkription von IL-2 (64, 65). Ein potentieller Suppressionsmechanismus betrifft die Konkurrenz um IL-2. Aufgrund der hohen konstitutiven Expression des hochaffinen IL-2-Rezeptors (CD25) auf Treg-Zellen können sie lokales IL-2 konsumieren, welches aktivierten Tkonv für die Proliferation entzogen wird und diese in Apoptose treibt (43, 66, 67). Allerdings sind Treg sowohl aus IL-2^{-/-} als auch aus IL-2ra^{-/-} Mäusen suppressiv (68, 69), weshalb dieser Mechanismus alleine die suppressive Wirkung von Treg nicht erklärt. Suppression von T-Zellen wird jedoch auch über andere Zytokine vermittelt, unter anderem von IL-10, IL-35 und TGF- β , was insbesondere in *in vivo*-Modellen nachgewiesen wurde (63, 70). Die selektive Ablation von IL-10 in Treg zeigte, dass deren IL-10 Produktion insbesondere für die Kontrolle von Immunreaktionen im Colon und der Lunge essentiell ist (71). Die IL-10-Wirkung kann zum einen direkt NF- κ B-vermittelte Signalwege inhibieren oder indirekt über seine Wirkung auf APCs Tkonv-Zellen supprimieren. IL-35 ist ein Heterodimer bestehend aus IL-12p35 und Ebi3. Im Modell der Transfercolitis (Tkonv-Transfer in T-Zell-defiziente Rezipienten) führte der Verlust einer der beiden Komponenten zum Funktionsverlust von IL-35 und die Treg-Zellen solcher IL-35-defizienten Mäuse konnten die lymphopene Colitis (im Unterschied zu wt-Treg) nicht inhibieren (72). TGF- β hat pleiotrope Funktionen und kann die Differenzierung von T-Zellen direkt beeinflussen, die Proliferation von Effektor-T-Zellen unterdrücken sowie über Bim-Aktivierung Apoptose induzieren (73). Von Treg produziertes TGF- β supprimiert u.a. T_H1- und T_H17-Antworten (74). TGF- β wird aber auch konstitutiv in vielen Geweben exprimiert und erhöht die Aktivierungsschwelle von potentiell autoreaktiven T-Zellen, um Immunreaktionen auf schwache Selbst-Antigene zu unterbinden (75). Neben diesen Zytokinwirkungen wurden auch für zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und Adenosin suppressive Wirkungen beschrieben. Von Treg-Zellen produziertes cAMP soll hierbei über *gap junctions* in T-Effektorzellen transferiert werden und diese inhibieren (76). Adenosin wird hingegen aus extrazellulärem Adenosintriphosphat (ATP) über die von Treg-Zellen exprimierten Ektoenzyme CD39 und CD73 generiert. Hierbei wird durch Gewebeschäden freiwerdendes ATP von CD39 durch Hydrolyse inaktiviert, das neu entstandene AMP durch CD73 auf tTreg und Tkonv in Adenosin umgewandelt und über A_{2A}-Rezeptoren von Effektor-T-Zellen aufgenommen, deren Proliferation es schlussendlich inhibiert (77-80). Darüber hinaus wurden auch zytotoxische Wirkungen von Treg-Zellen beschrieben, so z.B. das Abtöten von Zielzellen über Granzym B, Perforin (81, 82) oder Galektin-1 (83), wobei diese Wirkmechanismen bisher noch umstritten sind. In der Summe werden zahlreiche zellkontakt-/mikromilieu-abhängige Mechanismen beobachtet, der initial vermutete dominante Suppressionsmechanismus bisher aber nicht identifiziert. Da in Imaging-Studien nachgewiesen wurde, dass Treg und Effektor-T-

Zellen *in vivo* und *in vitro* während der Suppression nicht stabil interagieren (84, 85), bleibt fraglich, ob zellkontaktabhängige Mechanismen exklusiv für die suppressiven Eigenschaften von Treg verantwortlich sind.

1.3.2.2 Indirekte (APC-vermittelte) Suppression

CTLA-4 wird von tTreg konstitutiv intrazellulär exprimiert und nach ihrer Aktivierung an der Oberfläche präsentiert. Treg-Zellen binden über CTLA-4 an CD80/86 auf APCs und belegen so direkt die Bindungsstelle für CD28 von T-Effektorzellen (86-89). Dadurch erhalten diese selbst bei passender Antigenpezifität für das präsentierte Peptid kein kostimulatorisches Signal und werden deshalb nicht adäquat aktiviert. Darüber hinaus moduliert die Bindung von CTLA-4 an APCs deren Funktion, unter anderem durch die Induktion von Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO). IDO katalysiert die Umwandlung von Tryptophan in Kynurenin und weiterer pro-apoptotischer Moleküle. Dadurch kann die T-Zellaktivierung und Proliferation auf zwei Wegen inhibiert werden, zum einen durch die lokale Tryptophan-Verarmung, die sich negativ auf die Stimulierbarkeit von Tkonv-Zellen auswirkt und zum anderen induziert die Kynurenin-Ausschüttung der DCs direkt Apoptose in Tkonv (90-93). Zusätzlich regulieren DCs nach Interaktion mit CTLA-4 die Expression von CD80/CD86 und MHC-II herunter, wodurch die DC-Reifung unterbunden und ihre T-Zell-stimulierende Kapazität reduziert wird (94, 95). Das von Treg exprimierte CTLA-4 kann darüber hinaus auch direkt die Funktion von Tkonv beeinflussen, indem es die Expression der Transkriptionsfaktoren ICER/CREM (*inducible cAMP early repressor/cAMP response element modulator*) induziert. ICER/CREM bildet mit NFAT einen dominant inhibitorischen Komplex innerhalb des IL-2 Promotors und führt somit zur Inhibierung der IL-2-Synthese (96, 97). *In vivo* führt eine Blockade von CTLA-4 zu einem Verlust der Treg-vermittelten Suppression in entzündlichen Darmerkrankungen (88), bei Autoimmungastritis (89) sowie in Transplantationsmodellen (98). Ein zweites von tTreg und iTreg exprimierte Oberflächenmolekül mit Wirkung auf APCs ist das CD4-Homolog Lymphozyten-Aktivierungsgen-3 (*lymphocyte activation gene 3*, LAG-3). LAG-3 hat eine hohe Bindungsaffinität zu MHC-II (99) und inhibiert die Ausreifung immaturer DCs und damit ihre kostimulatorische Wirkung (100). Die Blockade von LAG3 vermindert die suppressive Aktivität von Treg-Zellen *in vivo* und LAG3^{-/-} tTreg-Zellen zeigen reduzierte regulatorische Aktivität *in vitro* (101). TIGIT (*T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains*) ist ein drittes Oberflächenmolekül mit DC-modulierender Wirkung. Es gehört in die Gruppe der Ig-Superfamilie, wird sowohl auf Treg- als auch auf aktivierten Tkonv-Zellen exprimiert und führt bei Interaktion mit DCs zu deren Produktion immunsupprimierender Zytokine wie IL-10 und TGF- β (102). Insgesamt scheint die Interaktion zwischen Treg und DCs für deren suppressive Wirkung *in vivo* essentiell zu sein und mittels Intravitalmikroskopie wurden (im Unterschied zur losen Treg-/Tkonv-Interaktion) stabile und langandauernde Interaktionen zwischen Treg und DCs nachgewiesen (85, 103). Diese Interaktionen werden u.a. durch Neuropilin-1 vermittelt,

das von den meisten tTreg exprimiert wird (104) und dessen Blockade die Treg-vermittelte Suppression inhibiert (105). Neben den oben genannten Oberflächenmolekülen modulieren aber auch lösliche Faktoren der Treg die DC Funktion. Latentes TGF- β , der inaktive TGF- β -Vorläufer, bindet durch Interaktion mit $\alpha_v\beta_8$ -Integrinen an DCs und wird somit funktionell aktiv (106). Die mukosale CD103⁺ DC-Subpopulation wird dadurch in die Lage versetzt, iTreg zu generieren (59). Auch das über die Ektoenzyme CD39 und CD73 produzierte Adenosin wirkt nicht solitär auf Effektor-T-Zellen, sondern inhibiert zusätzlich die Funktion von DCs (77, 79, 80). Von Treg sezerniertes IL-10 unterdrückt die Aktivierung von APCs durch die Erkennung von Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (*Pathogen associated molecular patterns*, PAMPs) über die Bindung an Toll-like-Rezeptoren (TLR), indem miRNA-vermittelt intrazellulär TLR-Signalkomponenten abgebaut oder direkt MyD88-abhängige Transduktionssignale unterdrückt werden (107). In der Summe zeigen Treg also eine pleiotrope Wirkung und ein promiskuitives Verhalten bezüglich der Zielzellen.

1.4 Hämatopoetische Stammzelltransplantation

Die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSZT) ist eine therapeutische Option für Patienten mit malignen und einigen nicht-malignen Erkrankungen des blutbildenden Systems. Ursprünglich wurde die HSZT als Organersatzverfahren entwickelt, bei dem die erkrankte Hämatopoese mittels Radio-/Chemotherapie eradiziert und durch die aus den Stammzellen gesunder Spender regenerierende Blutbildung ersetzt wird. Es zeigte sich jedoch sehr bald, dass die therapeutische Wirkung der HSZT nicht nur auf der Myeloablation basiert, sondern dass immunologische Effekte der Transplantation wesentlich zum Erfolg dieses Therapieverfahrens beitragen. Träger dieser immunologischen Effekte sind vor allem kotransplantierte Spender-T-Zellen, die aufgrund ihrer Alloreaktivität zur Eradikation der erkrankten Hämatopoese beitragen (Graft-versus-Hämatopoese-Wirkung bzw. Graft-versus-Leukämie Effekt, GVL), aber auch schwerwiegende Transplantationskomplikationen hervorrufen können, nämlich die Graft-versus-Host-Erkrankung (GVHD). Insofern müssen im Rahmen dieses komplexen Therapieverfahrens zahlreiche Aspekte berücksichtigt werden, die im Folgenden kurz beschrieben werden: Als Stammzellpräparate kommen entweder durch vielfache Aspiration gewonnenes Knochenmark in Frage (Entnahme unter Narkose), durch G-CSF (Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor)-Behandlung des Spenders ins periphere Blut mobilisierte HSZ, die mittels Aphereseverfahren aus dem Blut isoliert werden (108), oder Nabelschnurblut, das aufgrund der geringen Menge an HSZ hauptsächlich bei Kindern eingesetzt wird (109, 110). Um das Anwachsen der Stammzellpräparate zu gewährleisten, ist eine intensive Vorbehandlung der Patienten erforderlich. Diese sogenannte Konditionierungstherapie hat zahlreiche Funktionen. Sie muss immunsuppressiv wirken, um eine Abstoßung des Transplantats durch das Immunsystem des Patienten zu verhindern. Im

Knochenmark muss sie ausreichend Platz schaffen, um eine Einnistung der Spenderstammzellen in die Stammzellnische zu gewährleisten und bei Patienten mit maligner Grunderkrankung soll sie zytotoxische Wirkungen entfalten, um residuelle Leukämiezellen möglichst zu zerstören. Darüber hinaus muss auch nach Transplantation immunsuppressiv weiterbehandelt werden, um die Auslösung einer GVHD durch kotransplantierte Spender-T-Zellen zu verhindern. Die klassische Immunsuppression bei T-Zell-haltigem Transplantat besteht aus dem Calcineurininhibitor Cyclosporin A (CSA) in Kombination mit niedrig dosiertem Methotrexat (MTX). CSA vermindert die IL-2 Synthese und inhibiert so die Aktivierung und Proliferation von T-Effektorzellen (111), MTX ist ein immunsupprimierendes Zytostatikum, welches in die DNA-Synthese eingreift (112). Während die klassischen Konditionierungsprotokolle alle myeloablativ waren (komplette Zerstörung des Knochenmarks), wurden nach Entdeckung der anti-hämatopoetischen Wirkung von Spender-T-Zellen zunehmend auch dosisreduzierte und sogar nicht-myeloablativ Konditionierungsprotokolle entwickelt (113, 114), deren geringere Toxizität mittlerweile auch älteren Patienten Zugang zu Transplantationsverfahren ermöglicht (115).

Wie bereits beschrieben, ist die Rolle der kotransplantierten Spender-T-Zellen in der HSZT ambivalent. Sie sind die wichtigsten Mediatoren des GVL-Effekts (116) und verhindern dadurch Leukämie rezidive, schützen Empfänger vor opportunistischen Infektionen in der Frühphase nach HSZT (z.B. CMV- und EBV-Reaktivierung) (117, 118) und unterstützen das Anwachsen hämatopoetischer Stammzellen. Andererseits birgt die Kotransplantation reifer Spender-T-Zellen auch die Gefahr der Auslösung einer GVHD, bei der sich die Alloreaktion nicht nur gegen die Empfängerhämatopoese richtet, sondern gegen solide Organe, vor allem die Haut, die Leber und den Darm (119). Die wichtigste Maßnahme zur Vermeidung der GVHD ist die Wahl HLA-identer Spender-/Empfängerpaare. Im Idealfall werden HLA-idente Familienspender gewählt, andernfalls möglichst HLA-idente Fremdspender. Die für die Auslösung einer Alloreaktion wichtigsten HLA-Antigene sind HLA-A, -B und -C der MHC Klasse I sowie HLA-DR, -DQ und -DP der MHC Klasse II, die bei Mismatch direkt von Spender-T-Zellen erkannt werden und gegebenenfalls sogar unabhängig vom präsentierten Peptid eine T-Zell-Reaktion auslösen. Deshalb schreibt die Europäische Gesellschaft für Blut und Knochenmarktransplantation für Transplantate nicht-verwandter Spender den Abgleich von 10 Allelen in 5 HLA-Loci vor (126), nämlich HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 und HLA-DQB1 (127). Doch selbst bei HLA-Identität kann eine GVHD entstehen, die in solchen Fällen auf Minor-Histokompatibilitätsantigene (miHA) zurückzuführen ist. MiHA sind prozessierte und präsentierte Peptide polymorpher Proteine, die in Spender und Empfänger differentiell exprimiert werden (120). Da Spender-T-Zellen im Rahmen ihrer thymischen Entwicklung nicht gegen diese polymorphen Empfängerproteine tolerisiert wurden, können Spender-T-Zellen gegen diese Peptide reagieren (121). Da die GVHD Hauptursache der hohen Morbidität und

Mortalität nach HSZT ist, wurden zahlreiche Ansätze zur Optimierung der HSZT verfolgt, um die GVHD Erkrankung zu vermeiden. Hierzu zählen die Depletion reifer T-Zellen (*T cell depletion*, TCD) aus dem Transplantat durch Positivselektion von CD34⁺ Stammzellen (122, 123), die Depletion von CD3⁺ oder TCRαβ⁺ T-Zellen (123, 124) oder deren *in vitro* oder *in vivo* Depletion mittels Anti-Lymphozyten-Seren (125). Diese Technologien werden in besonderen Transplantationskonstellationen erfolgreich eingesetzt (z.B. bei haploidenten Transplantationsverfahren), vermindern in der Summe aber die GVL-Aktivität der HSZT und erhöhen das Risiko für opportunistische Infektionen, so dass sie in der Breite bisher nicht zu einer Verbesserung der Behandlungsergebnisse führten (126, 127). Aus diesem Grund ist die Entwicklung verbesserter Transplantationsstrategien, die eine ausreichende GVL-Aktivität für die Heilung von Leukämiepatienten gewährleisten ohne eine GVHD zu induzieren, noch immer zentrales Thema präklinischer und klinischer Forschung in diesem Bereich.

1.5 Graft-versus-host disease (GVHD)

Die GVHD ist eine Reaktion reifer T-Lymphozyten des Spenders gegen das Gewebe des Empfängers und kann in akuter (aGVHD) oder chronischer (cGVHD) Form auftreten. Initial wurde diese Unterteilung alleine anhand des zeitlichen Auftretens der Symptome unterschieden. Hierbei galt, dass die aGVHD innerhalb der ersten drei Monate nach Transplantation auftritt (128), die cGVHD frühestens ab Tag 100 nach HSZT (129). Diese Definition war in der klinischen Praxis wenig zufriedenstellend und wurde 2014 nach einer Konsensuskonferenz des NIH (*National Institute of Health*) modifiziert. Der neuen Klassifikation liegt die unterschiedliche Präsentation von aGVHD und cGVHD zu Grunde, sodass die Einteilung anhand der Symptomatik unabhängig vom Zeitpunkt der Diagnosestellung stattfindet. Eine aGVHD wird diagnostiziert bei makulopapulärem oder erythematösem Hautausschlag, cholestatischer Hepatitis sowie gastrointestinalen Symptomen wie Übelkeit, Erbrechen, Anorexie und anhaltende schwere Diarrhö und Colitis (130). Im Unterschied zum akut inflammatorischen Bild der aGVHD, ähnelt die cGVHD mehr chronischen Autoimmunerkrankungen und kann in der Tat sämtliche Symptome solcher Erkrankungen imitieren. Typische Symptome sind sklerotische und Lichen Planus-artige Veränderungen der Haut sowie der Mundschleimhaut, Strikturen oder Stenosen des Ösophagus, Bronchiolitis obliterans, Faszitis und/oder Gelenksteifigkeit sowie sklerodermiforme Veränderungen (130). Die Inzidenz der aGVHD liegt bei 20-80% und ist, genauso wie deren Schweregrad, abhängig vom Grad der Histokompatibilität zwischen Spender und Empfänger, der Anzahl an reifen T-Zellen im Transplantat, dem Alter des Empfängers sowie der Art der Konditionierung (131). Zielorgane der aGVHD sind neben Haut, Leber und Darm auch die Hämatopoese inklusive des lymphatischen Systems (132). Die klassische klinische Einteilung des aGVHD-Schweregrades erfolgt anhand der Kumulation klinischer Veränderungen in den Zielorganen

Haut, Leber (hier laborchemische Evaluation) und GI-Trakt sowie des allgemeinen Erscheinungsbildes (133). Während milde Formen der aGVHD (Grad I oder II) nur eine geringe Morbidität und nahezu keine Mortalität aufweisen, zeichnen sich schwerere Formen durch steigende Mortalität (Grad IV GVHD > 90%) aus (133). Daneben gibt es auch neuere Einstufungen des aGVHD-Schweregrades, die eine bessere Korrelation zur transplantationsassoziierten Mortalität aufweisen (134, 135).

1.5.1 Pathophysiologie der akuten GVHD

Die Pathophysiologie der aGVHD ist sehr komplex und kann schematisch in drei sequentielle Phasen eingeteilt werden: Phase 1 beinhaltet die Effekte der Konditionierung, Phase 2 die Aktivierung der kotransplantierten Donor-T-Zellen und Phase 3 die Effektorphase (131, 136).

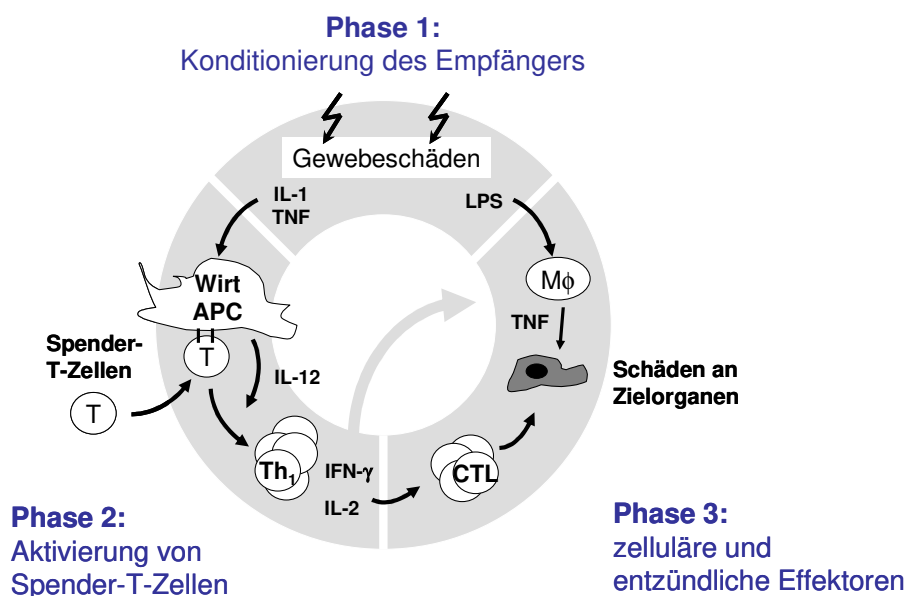


Abb. 1.3: Entstehung der aGVHD nach allogener KMT. Modifiziert nach Hill und Ferrara (114).

In der Konditionierungsphase werden durch Chemo- und/oder Strahlentherapie Gewebeschädigungen hervorgerufen, wodurch große Mengen proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 und TNF ausgeschüttet werden (113, 136). Dies erhöht die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Epithelzellen sowie kostimulatorischen Molekülen und MHC-Antigenen auf APCs (137, 138). Darüber hinaus kommt es durch die konditionierungsbedingte Toxizität am Darmepithel zu Schädigungen der Mukosa und zu endothelialer Apoptose. Dadurch werden „Gefahren-Signale“ ausgeschüttet, z.B. Hitzeschockproteine und durch Gefäßschäden entstehende Abbaustoffe von Hyaluron, was die Aktivierung von Empfänger-APCs weiter verstärkt (139). Die gestörte Barrierefunktion des Darmes führt zur Einwanderung von Bakterien und immunstimulatorischen mikrobiellen Produkten wie zum Beispiel Lipopolysacchariden (LPS) aus dem Darmlumen in das gastrointestinale Gewebe (136, 140). Dies perpetuiert die Sekretion von IL-1 und TNF und induziert die Produktion von geweбетoxischem Stickstoffmonoxid (NO) durch gewebeständige Makrophagen (136), was die Inflammation

weiter befeuert. In Phase 2 treffen reife Spender-T-Zellen aus dem Transplantat auf dieses pro-inflammatorische Milieu. Die reifen T-Zellen wandern initial in die sekundären lymphatischen Organe (141) und erkennen dort durch direkte oder indirekte Alloantigenpräsentation differente MHC-Moleküle (140, 142) oder miHAs (143, 144). Nach ihrer Aktivierung, klonalen Expansion und Differenzierung in Effektor-T-Zellen sezernieren alloreaktive T-Zellen ihrerseits pro-inflammatorische Zytokine wie IFN- γ und IL-2, was wiederum zur Aktivierung von CTLs, Monozyten/Makrophagen und NK-Zellen führt (145, 146). Dieser sogenannte „Zytokinsturm“ perpetuiert sich und induziert weitere pro-inflammatorische Zytokine sowie Chemokine zur Migration von Effektor-Zellen in die GVHD-Zielorgane (140, 147), wo durch die konditionierungsbedingte Inflammation Adhäsionsmoleküle und Chemokine in Endothelien und Epithelzellen überexprimiert werden. Dadurch wandern in der dritten Phase der aGVHD vor allem aktivierte Effektor-T-Zellen und NK-Zellen, aber auch Neutrophile, Monozyten und Makrophagen vermehrt in die Zielgewebe ein (148). Aktivierte Spender-T_H1-Zellen migrieren aufgrund ihrer CCR9- und CCR5-Expression präferentiell in den GI-Trakt und die Leber, während aktivierte Spender-T_H2-Zellen via CCR4 hauptsächlich in die Lunge wandern, wo sie IL-4, -5 und -13 ausschütten, was zur dortigen Inflammation und gegebenenfalls zur Lungenfibrosierung führen kann (149). Aktivierte CTLs und NK-Zellen lysieren über die Fas/Fas-Ligand und Perforin/Granzym Signalwege sowohl hämatopoetische als auch solide Gewebe des Empfängers, wodurch sie die Gewebeschädigung weiter verstärken (150, 151) und den schwer regulierbaren Teufelskreis aufrecht erhalten.

1.6 Der GI-Trakt als immunologisches System

Der Gastrointestinaltrakt ist in seiner Gesamtheit das größte Immunorgan und insofern besonders, als er als innere Körperoberfläche beim Menschen ungefähr die Fläche eines Fußballfeldes einnimmt und von einer unzähligen Anzahl an Mikroorganismen besiedelt ist, die lediglich durch eine einzellige Epithelschicht vom Körperinneren getrennt sind. Darüber hinaus erfordert seine resorptive Funktion die Aufnahme von Nahrungsbestandteilen, ohne gleichzeitig infektiöse Erregern oder deren PAMPs die Transmigration zu gewähren. Die Selektivität des GI-Immunsystems zur Bekämpfung pathogener Mikroorganismen bei simultaner Ignoranz des apathogenen und für die Verdauungsfunktion wichtigen Mikrobioms ist bisher noch unzureichend verstanden. Die erste physikalische Grenze wird von einer viskösen Mukusschicht auf der intestinalen Mukosa sowie von intestinalen Epithelzellen (*intestinal epithelial cells*, IEC) gebildet, die über sogenannte "*tight junctions*" verbunden einen dichten Zellrasen bilden. Der Mukus wird von spezialisierten IEC, den Becherzellen (*goblet cells*), gebildet und enthält in der IEC-nahen Schicht bakterizide Metabolite, die pathogene Inhaltsstoffe des Lumens vom körpereigenen Gewebe fernhalten (152). Zu den bakteriziden Metaboliten und löslichen Bestandteilen des Immunsystems im Mukus gehören unter anderem

Defensine, kurzkettige Fettsäuren, antimikrobielle Peptide (AMP) sowie von Plasmazellen sezerniertes IgA. Im Dickdarm ist die Anzahl an Becherzellen und damit die Viskosität der Mukusschicht sehr viel höher als im Dünndarm (153). Im Dünndarm übernehmen dafür Paneth-Zellen die Produktion weiterer antimikrobieller Moleküle wie z.B. Proteine der Reg3-Familie (*regenerating islet-derived 3*) (154). IEC können auch selbstständig auf Pathogene reagieren indem sie TLRs exprimieren, die in Abhängigkeit von der bakteriellen Last im Lumen reguliert werden (155).

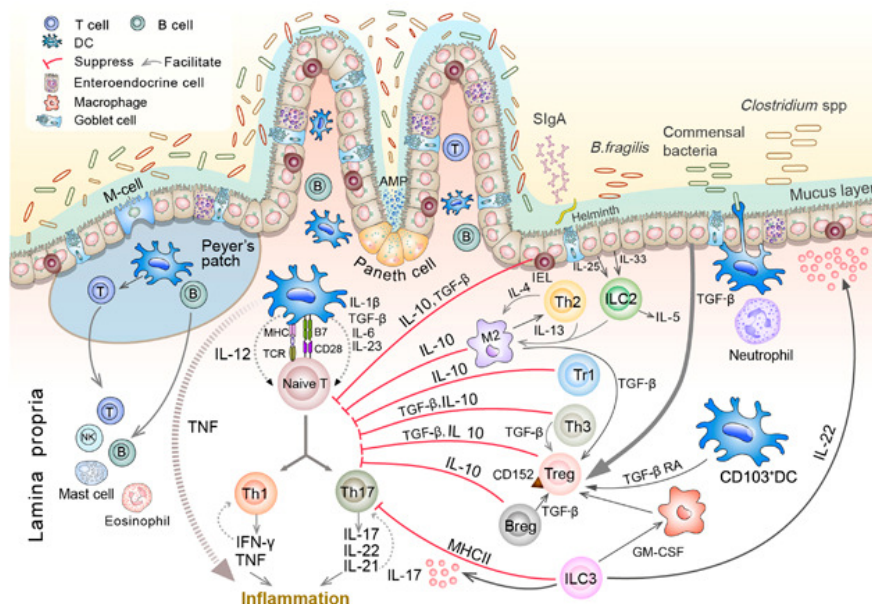


Abb. 1.4: Immunologische Homöostase im GI-Trakt. Aus Sun et al. (156)

Gelangen Pathogene durch diesen ersten Schutzwall, reagieren bereits in der Epithelschicht Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems. Diese sogenannten intraepithelialen Lymphozyten (IEL) befinden sich in Zwischenräumen der intestinalen Epithelzellen und werden zwei T-Zellkategorien zugeordnet, nämlich sogenannten natürlichen und induzierten IEL (157). Natürliche IEL werden im Thymus generiert und sind durch ihren stabilen Phänotyp charakterisiert. Zu ihnen zählen $\gamma\delta$ -T-Zellen sowie $\alpha\beta$ -T-Zellen, die entweder negativ für die beiden Korezeptoren CD4 und CD8 sind oder das CD8 $\alpha\alpha$ -Homodimer tragen (157). Die sogenannten induzierten IEL rekrutieren sich aus peripheren TCR- $\alpha\beta$ -positiven Tkonv-Zellen und exprimieren im Epithel unter dem Einfluss des lokalen Mikromilieus entweder kein CD4 und CD8 (doppelt negativ), CD4 oder CD8 $\alpha\beta$ einzeln, oder aber CD4 in Kombination mit CD8 $\alpha\alpha$. Das CD8 $\alpha\alpha$ -Homodimer ist intrazellulär an den TCR mit inhibitorischen Signalkaskaden gekoppelt und fungiert als TCR-Korepressor (158). Sowohl natürliche als auch induzierte IEL schützen vor Pathogenen aus dem Darmlumen, indem sie nach Antigenkontakt durch die Sekretion von IFN- γ und TNF zur Initiierung einer Immunantwort beitragen (159). Intestinale $\gamma\delta$ -TCR IELs vermitteln jedoch auch immunregulierende Funktionen durch Sekretion von TGF- β und IL-10 (160). Nach Aktivierung produzieren $\gamma\delta$ -T-Zellen außerdem Keratinozytenwachstumsfaktoren, die das Epithel zur

Proliferation anregen und damit zu dessen Reparatur nach Gewebeschäden beitragen (161). Beide Arten von IEL haben einen aktivierten Phänotyp und exprimieren konstitutiv das Retentionsmolekül CD103, was sie an der Rezirkulation hindert.

Lamina propria Leukozyten (LPL) bestehen aus einem breiten Repertoire an Immunzellen, darunter T-Lymphozyten ($CD4^+ > CD8^+$), B-Lymphozyten, DCs, Makrophagen, Monozyten, neutrophile sowie eosinophile myeloide Zellen und lymphoide Zellen des angeborenen Immunsystems (*innate lymphoid cells*, ILCs) (156). In der LP sind verschiedene $CD4^+$ T-Zellsubtypen vertreten, die unterschiedliche Funktionen der Abwehr gegen Pathogene übernehmen. Darunter fallen T_H1 - (Zytotoxizität und Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine), T_H2 - (IgE-Produktion, Abwehr von Parasiteninfektionen und allergische Sensibilisierung) und T_H17 -Zellen (Abwehr gegen extrazelluläre Pathogene) sowie ein vergleichsweise hoher Anteil an tTreg und pTreg-Zellen (162). Die erste Linie der Immunabwehr wird jedoch von myeloischen Zellen geleistet, da Neutrophile bereits früh nach Pathogeninvasion rekrutiert werden und diese eliminieren. Makrophagen und DCs reagieren auf Pathogene mit der Sekretion von Zytokinen und Chemokinen zur Induktion und Regulation inflammatorischer Immunantworten. Je nach DC-Subtyp (tolerogene $CD103^+$ DC oder inflammatorische $CD103^-$ DC) führt deren Peptidpräsentation zur unterschiedlichen T-Zell-Antworten. Tolerogene $CD103^+$ DCs schütten TGF- β und Retinsäure aus, was zur Induktion von pTreg führt und die TGF- β /IL-6 getriebene Differenzierung in T_H17 -Zellen verhindert (163). Abhängig vom Zytokinmilieu in der LP differenzieren entweder pro-inflammatorische, durch IFN- γ induzierte M1-Makrophagen oder regulatorische, durch IL-4 und IL-13 induzierte M2-Makrophagen aus. M1-Makrophagen sezernieren ihrerseits TNF und treiben so eine inflammatorische Immunantwort an, während M2-Makrophagen T-Effektorzellen entweder direkt durch Sekretion von IL-10 inhibieren oder durch die Sekretion von TGF- β zur Induktion von pTreg beitragen (156). Zur Gruppe der ILCs gehören neben NK-Zellen auch die erst kürzlich charakterisierten ILC der Gruppen 1-3. In Analogie zum T-Zell-System werden diese Zellen des angeborenen Immunsystems anhand ihres Zytokinprofils kategorisiert (164). Zur Gruppe 1 gehören sowohl NK- als auch ILC1-Zellen, die durch inflammatorische Zytokine aktiviert werden und ihrerseits in der Lage sind, IFN- γ und TNF zu sezernieren. Gruppe 2 ILCs werden von Zytokinen aktiviert, die von Epithelzellen produziert werden. Schütten beschädigte Epithelzellen die Alarmine IL-25 und IL-33 aus, werden ILC2-Zellen dazu angeregt, IL-5 und IL-13 zu sezernieren, was wiederum M2-Makrophagen induziert (165). Außerdem vermitteln ILC2 die Abwehr gegen Parasiten (164). Gruppe 3 ILCs sind eine heterogene Gruppe, die aus $CCR6^+$ LTi-Zellen (*lymphoid tissue inducer*) und mindestens zwei Untergruppen von ILC3 besteht, die voneinander durch die Expression von NKp46 unterschieden werden. LTi-Zellen unterstützen die Entstehung von Lymphknoten und Peyer's Patches sowie anderen lymphoiden Strukturen. $NKp46^+$ ILC3 können Antigene präsentieren und sezernieren IL-22, das essentiell für die

Reparatur beschädigten Epithels ist (166). NKp46⁺ILC3 hingegen produzieren nach Aktivierung IL-17 und aggravierern in Colitis-Modellen die Symptomatik (167). Die intestinale Homöostase ist also das Ergebnis eines fein orchestrierten Zusammenwirkens verschiedenster immunologischer Zelltypen in Epithel und Lamina propria.

1.7 Der GI-Trakt als Hauptzielorgan der GVHD

Der GI-Trakt ist Zielorgan der aGVHD und eine schwere Darmbeteiligung hauptsächlich für die Mortalität der aGVHD verantwortlich. Sowohl die Konditionierungsschäden als auch die Alloreaktion selbst tragen zur Schädigung der intestinalen Homöostase bei. Nach Schädigung der Epithelzellgrenze führt die Translokation von Mikroorganismen und mikrobieller Produkte wie LPS und anderer PAMPs zur Perpetuierung der gastrointestinalen Inflammation. In murinen (113) und klinischen (168) Studien konnte bereits früh gezeigt werden, dass die Bestrahlungsdosis invers mit der Barrierefunktion des Darmepithels korreliert. Die Reparatur solcher Darmschäden scheint in der aGVHD allerdings gestört zu sein, da in tierexperimentellen Studien z.B. die von ILC3 via ihrer IL-22-Sekretion geförderte Epithelregeneration deutlich vermindert ist (169). Ähnlich zeigt sich sowohl in Mäusen (170-172) als auch in Menschen (173) ein Verlust von Paneth-Zellen (PZ) bei GI-GVHD und damit einhergehend eine Verminderung der von ihnen produzierten antimikrobiellen Peptide Reg3 γ (murin) bzw. Reg3 α (human) im Darm, während Reg3 α gleichzeitig vermehrt im Serum nachgewiesen und deshalb mittlerweile als Biomarker genutzt wird (172, 174). Der Verlust von Paneth-Zellen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung korreliert direkt mit dem Mortalitätsrisiko (173). Da Paneth-Zellen zur Integrität der epithelialen Stammzellnische beitragen, wird die Regenerationsfähigkeit des Epithels auch auf dieser Ebene beeinträchtigt (171). Die GI-Inflammation führt darüber hinaus zum Zusammenbruch lymphoider Regulationsmechanismen, unter anderem abzulesen an der gestörten humoralen Immunität (175, 176). So ist z.B. die IgA-Konzentration im intestinalen Lumen von Mäusen (170) und Patienten (177) nach Transplantation deutlich reduziert. Gemeinsam mit dem Verlust der von Paneth-Zellen sezernierten anti-mikrobiellen Peptide führt dies zu einer verringerten Abwehr gegen pathogene Keime (darunter *Lactobacillae* und *Enterobacterales*). Diese siedeln sich im Verlauf (und abhängig vom Schweregrad der aGVHD) zunehmend im GI-Trakt an und verdrängen damit kommensale Bakterien (170, 171, 178). *Firmicutes*, denen regulatorische Funktionen wie die Induktion von Treg-Zellen im GI-Trakt zugesprochen werden (179), gehen im Setting der murinen aGVHD verloren (180). In Patienten hingegen findet schon ohne aGVHD eine Verschiebung in der Mikrobiom-Komposition statt (181), was vor allem auf den Einsatz von Antibiotika vor oder nach HSZT zurückzuführen ist (182). Es wurde aber auch ein direkter Einfluss der GVHD auf das Mikrobiom von Patienten nachgewiesen, der dem im murinen Modell entspricht (170, 183). In der Summe wird die Homöostase des GI-Trakts im

Rahmen der aGVHD auf allen Ebenen schwer gestört, was die hohe Mortalität dieser GVHD-Manifestation erklärt.

1.8 Therapie der aGVHD

Kortikosteroide sind die Therapie der Wahl bei aGVHD und ihre Wirksamkeit in klinischen Studien nachgewiesen. Eine milde Haut-GVHD kann mit topischen Steroiden behandelt werden, schwerere Formen der aGVHD erfordern hochdosiert systemische Steroide. Sprechen Patienten initial gut auf diese Behandlung an, korreliert dies in den meisten Studien direkt mit dem Überleben (184). Bei starker Darm-GVHD werden Steroide initial intravenös (iv) verabreicht, um angemessene Serumspiegel sicherzustellen. Entfalten die Steroide keine therapeutische Wirkung, gibt es bisher keine zugelassene Zweitlinientherapie und das Langzeitüberleben bei schwerer aGVHD liegt nur bei 5-30% (185). Nach Steroidversagen wird meist eine Kombinationstherapie aus Steroiden mit anderen Substanzen eingesetzt. Verwandt werden Inhibitoren von mTOR (*mammalian target of rapamycin*, Sirolimus®) (186), Anti-Thymozyten-Globulin (ATG), TNF-Antagonisten (Etanercept, Infliximab, Adalimumab®), Purinsynthesehemmer wie Pentostatin, MMF (Mycophenolat Mofetil, zytostatisch für B- und T-Zellen) sowie Signaltransduktionshemmer wie Ruxolitinib (Januskinasehemmer). Die Ansprechraten dieser Kombinationen sind leider gering (185) und werden in manchen Studien mit höherer Nicht-Rezidiv-vermittelter Mortalität in Verbindung gebracht (187). Insgesamt weisen die klinischen Daten darauf hin, dass der sequentielle Einsatz pharmakologischer Immunsuppressiva die GVHD-Pathophysiologie nicht effizient durchbrechen kann. Eine weitere Therapiemöglichkeit in der GVHD-Behandlung ist die extrakorporale Photopherese (188). Hierbei werden aus dem peripheren Blut des Patienten mittels Leukapherese Leukozyten isoliert, denen der DNA-interkalierende Wirkstoff 8-Methoxypsoralen (8-MOP) zugesetzt wird, der durch UV-Bestrahlung aktiviert wird (189). Die Zellen werden danach reinfundiert und wirken durch die Apoptoseinduktion immunmodulierend, sollen aber auch Treg induzieren. Insgesamt ist der Wirkmechanismus der Photopherese bisher unklar, reduziert aber auch im murinen GVHD-Modell die Schwere und Mortalität der GVHD (190).

1.9 Rolle der Treg in der aGVHD

Initial wurden CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen als anerge Zellpopulation beschrieben, die autoreaktive Tkonv-Zellen effizient supprimiert und dadurch Autoimmunität verhindert (27, 191, 192). Die Tatsache, dass Treg selbst keinerlei pro-inflammatorische Aktivität aufwiesen, Tkonv in ihrer Aktivierung und Proliferation aber inhibieren, weckte das Interesse von Transplantationsimmunologen bezüglich der Rolle von Treg in der HSZT. In tierexperimentellen Studien wurde nachgewiesen, dass Spender-Treg nach MHC-differenter Transplantation keine GVHD induzieren können, dass deren Kotransplantation die von Spender-Tkonv-Zellen

ausgelöste aGVHD aber effizient verhindern kann (193-199). Dazu musste lediglich die Treg-Frequenz über das physiologische Verhältnis hinaus auf 1:1 erhöht werden (197). Die kotransplantierten Treg-Zellen verhinderten die frühe Expansion alloreaktiver Tkonv-Zellen nach Transplantation, führten aber nicht zu ihrer Eliminierung oder kompletten funktionellen Inaktivierung (198, 200). In Leukämie- und Lymphommodellen konnte deshalb gezeigt werden, dass die GVL-Aktivität der Tkonv-Zellen erhalten bleiben kann, obwohl die letale aGVHD durch den Treg-Transfer verhindert wird (198). Auch das Engraftment von Stammzellen blieb vom Treg-Transfer unbeeinträchtigt, während die hämatopoetische Rekonstitution sowie die lymphatische Funktion nach Transplantation durch die Unterdrückung der aGVHD sogar verbessert wurden (194, 196, 201). Für einen effizienten Schutz vor aGVHD mussten Treg in der Lage sein, in sekundär lymphatische Organe zu migrieren (202). Nach Transfer von CD62L (L-Selektin)-positiven oder CD62L-negativen Spender-Treg waren nur CD62L-positive Zellen in der Lage, aGVHD zu verhindern (200, 203). CD62L bindet an Liganden in lymphatischen Organen (PNAd, *peripheral node addressin*) und ermöglicht den Zellen über *high endothelial venules* ins Gewebe einzuwandern (204). In Nachfolgestudien wurde nachgewiesen, dass nur Foxp3⁺ tTreg vor aGVHD schützen, während *in vitro* differenzierte iTreg insuffizient sind und ihre Foxp3-Expression in der inflammatorischen Umgebung *in vivo* verlieren (35, 205-208).

Für die Überprüfung dieser präklinischen Ergebnisse in klinischen Studien wurden in der Folge GMP-kompatible (*good manufacturing practice*) Methoden zur Anreicherung von humanen Treg-Zellen aus dem Blut von Stammzellspendern etabliert (209). In ersten Phase I-II Studien zeigte sich dann, dass der adoptive Transfer von Spender-Treg in der Tat vor aGVHD schützt, da insbesondere nach haploidenter HSZT kaum aGVHD beobachtet wurde, obwohl keine begleitende Immunsuppression verabreicht und T-Zellzahlen transferiert wurden, die in dieser Transplantationskonstellation eine schwere aGVHD hätten auslösen müssen (210, 211). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass sich die tierexperimentellen Befunde wahrscheinlich auf die klinische HSZT übertragen lassen.

Auf diesen Befunden aufbauend sollte in der vorliegenden Arbeit nun in tierexperimentellen Studien untersucht werden, ob Spender-Treg nicht nur prophylaktisch, sondern auch therapeutisch (bei bereits bestehender aGVHD) wirksam sind. Da Treg im peripheren Blut nur in sehr geringer Anzahl vorliegen, ist für potentielle klinische Anwendungen deren *in vitro* Expansion erforderlich. Diese Situation sollte auch tierexperimentell nachgestellt werden, weshalb die von einigen Arbeitsgruppen entwickelten Expansionsprotokolle für humane Treg (209, 212-215) ins murine Modell übertragen wurden.

2 Zielsetzung

Die schwere aGVHD ist eine bedrohliche Komplikation nach allogener HSZT und hauptsächlich für die hohe Morbidität und Mortalität dieses Therapieverfahrens verantwortlich. Sie wird durch kotransplantierte Spender-T-Zellen ausgelöst, die durch ihre Graft-versus-Leukämie-Wirkung andererseits für die Heilung von Leukämie- und Lymphompatienten essentiell sind. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass die Kotransplantation angereicherter Spender-Treg-Zellen Empfängertiere vor der Entwicklung einer letalen aGVHD schützen kann. In dieser Promotionsarbeit soll nun untersucht werden, ob Spender-Treg-Zellen in der Behandlung der aGVHD auch therapeutisch wirksam sind. Hierfür wird ein haploidentes KMT-Modell (BALB/c bzw. C57BL/6 → CB6F1) etabliert und die Kinetik der GVHD-Entwicklung charakterisiert. Nach Ermittlung eines geeigneten Therapiezeitpunkts (signifikante klinische Symptomatik und histologischer Nachweis einer bestehenden aGVHD) sollen die Tiere mit *in vitro* expandierten Spender-Treg-Zellen behandelt werden. Zu diesem Zweck müssen die Isolierung und *in vitro* Expansion einer geeigneten Treg-Startpopulation optimiert werden, wobei insbesondere die von J. Bluestone und Kollegen eingesetzte CD62L⁺ Subpopulation der CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen untersucht wird. Der Einfluss eines Treg-Transfers auf die bestehende aGVHD soll dann anhand klinischer Symptome (Fellbeschaffenheit, Gewichtsentwicklung, Körperhaltung, Aktivitätsgrad) sowie anhand von Überlebenskurven beurteilt werden. Zu vorab festgelegten Untersuchungszeitpunkten soll insbesondere der GI-Trakt als wichtigstes Zielorgan der aGVHD im Detail analysiert werden, wofür histologische Untersuchungen durchgeführt und die zellulären und molekularen Signalwege der GI-GVHD charakterisiert werden. Zusätzlich wird der Einfluss der Treg-Therapie auf die lympho-/hämatopoetische Rekonstitution nach KMT untersucht werden, die in Tiermodellen und Patienten bei schwerer aGVHD regelmäßig beeinträchtigt ist. Insgesamt sollen diese Untersuchungen klären, ob die physiologischen Suppressionsmechanismen von Treg-Zellen zur Therapie der aGVHD ausgenutzt werden können und welchen Stellenwert die zellvermittelte Suppression für die Toleranzentwicklung nach allogener HSZT hat.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien, Reagenzien	Hersteller
2-Mercaptoethanol (2-ME, Lsg., 50 μ M)	Gibco, Auckland
LE-Agarose	Biozym, Oldendorf
α -CD3 ϵ Antikörper, purified	BD, Heidelberg
Antibody-Diluent für IHC	Dako, Jena
Ammoniumchlorid (NH ₄ CL)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Aqua dest.	B. Braun, Melsungen
Brilliant III SYBR Green QPCR Master Mix	Agilent, CA USA
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Carboxy-Fluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester (CFSE)	Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim
Citronensäure-monohydrat (C ₆ H ₈ O ₇ ·H ₂ O)	Merck, Darmstadt
Cytofix/Cytoperm	BD Pharmingen, CA USA
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, Steinheim
3,3-Diaminobenzidin (DAB)-Kit	Dako, Jena
Diethyldicarbonat (DEPC)	Carl Roth, Karlsruhe
DL-Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DNase I	Roche, Mannheim
Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) w/o L-Glutamin	Gibco, CA USA
Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) w/o L-Glutamin + Phenolrot	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethylendiamontetraacetat (EDTA) Lsg., 0,5 M	Sigma-Aldrich, Steinheim
EDTA-dinatriumsalz	Sigma-Aldrich, Steinheim
Entellan (Eindeckmedium)	Merck, Darmstadt
Eosin-Lösung	Carl Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid (Lsg., 10mg/ml)	Sigma-Aldrich, Steinheim

FACSClean	BD, Heidelberg
FACSFlow	BD, Heidelberg
FACSRinse	BD, Heidelberg
Ficoll	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fix/Perm	eBiosciences, Frankfurt
Formaldehyd (Lsg., 37%)	Merck, Darmstadt
Formamid	Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA, Pasching
Golgi-Stop (Monensin)	BD, Heidelberg
Hämatoxylin-Lösung	Carl Roth, Karlsruhe
Hanks balanced salt solution (HBSS) 1x	Sigma-Aldrich, Steinheim
Hanks balanced salt solution (HBSS) 10x	Sigma-Aldrich, Steinheim
Hydrogenchlorid (HCL) 1 N	Roth, Karlsruhe
Heparin-Natrium	Ratiopharm
HEPES-Puffer (1 M)	PAN, Aidenbach
Ionomycin	Alexis, Lausen Schweiz
Isopropanol (99%)	Universität Regensburg
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO₃)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Liberase TM	Roche, Mannheim
L-Glutamin (Lsg., 200 mM)	PAA, Pasching
Live/Dead Fixable Blue Stain Kit	Thermo Fisher, MA USA
Natriumacetat	Applichem, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH, Lsg., 1N)	Roth, Karlsruhe
Natriumpyruvat (Lsg., 100 mM)	PAN, Aidenbach
Natriumcitrat-dihydrat (C₆H₅Na₃O₇·2-H₂O)	Merck, Darmstadt
Minimum essential medium – nonessential amino acids (MEM NEAA)	PAN, Aidenbach
M-MLV Reverse Transcriptase	Promega, Mannheim
3-N-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	Applichem, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) 10.000 UE/10.00 µg pro ml	Gibco, CA USA
Percoll	Sigma-Aldrich, Steinheim

Permeabilisierungspuffer (10x)	eBioscience, Frankfurt
Perm/Wash-Puffer (10x)	BD, Heidelberg
Peroxidase-Block	Dako, Jena
Phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Propidiumiodid (PI)	Fluka/Sigma-Aldrich, Steinheim
Rekombinantes humanes Interleukin 2 (IL-2)	Chiron, Amsterdam, Niederlande
RLT-Puffer	Quiagen, Hilden
RNAlater	Ambion, Oberursel
RNEasy Mini Kit	Quiagen, Hilden
RPMI 1640	Lonza, Basel
Trypanblau (0,4%)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Türks-Lösung	Merck, Darmstadt
Xylol	Carl Roth, Karlsruhe
Waschpuffer-Konzentrat 10x für IHC	Dako, Jena

Tabelle 3.1: Chemikalien und Reagenzien

3.1.2 Medien, Puffer und Lösungen

Medium/Lösung	Hersteller/Herstellung
ACK-Lysepuffer (6x)	24,82 g NH_4Cl (0,155 M) 3,00 g KHCO_3 (0,1 M) 0,11 g EDTA-Di-Natriumsalz (0,1 mM) in Aqua dest lösen. pH auf 7,4 einstellen. Mit Aqua dest auf 500 ml auffüllen
ACK-Lysepuffer (1x)	Bei Gebrauch frisch anzusetzen: 1 ml ACK-Lysepuffer (6x) 5 ml Aqua dest.
Citratpuffer	Lsg A: 2,1g $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ in 100 ml Aqua dest Lsg B: 29,41g $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{-H}_2\text{O}$ in 1 l Aqua dest 1 ml Lsg A 49 ml Lsg B auf 500 ml mit Aqua dest auffüllen pH auf 7,2 einstellen
CFSE Stock- und Gebrauchslösung	Stock: 25 mg CFSE-Pulver in 8,96 ml DMSO lösen (5 mM) Gebrauchslösung herstellen durch serielle Verdünnungen: (1) 30 μl Stocklösung + 2970 μl DPBS (50 μM) (2) 200 μl aus (1) + 4800 μl DPBS (2 μM) (3) 500 μl aus (2) + 500 μl DPBS (1 μM)

Complete DMEM (cDMEM) Medium	DMEM w/o L-Glutamin Medium 10% FCS 2mM L-Glutamin 10mM HEPES-Puffer 50 µM 2-Mercaptoethanol 1mM Natrium-Pyruvat 1% MEM-NEAA 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
DAB-Gebrauchslösung	1:50 verdünnt mit Aqua dest.
DEPC-Wasser	1 ml Aqua dest 1 ml DEPC 24h äquilibrieren lassen autoklavieren
DMEM/HEPES	DMEM w/o L-Glutamin und Phenolrot Medium 20 mM HEPES
DPBS 10% (DPBS/10)	DPBS 10% FCS
FACS-Puffer	DPBS 2% FCS
HBSS/EDTA	HBSS 1x Medium 0,5 M EDTA
MACS-Puffer (entgast)	DPBS 2mM EDTA 1% FCS
20x MOPS-Puffer	300 ml DEPC-Wasser 42 g MOPS 4,1 g Natriumacetat 3,7 g EDTA pH mit NaOH auf 7,0 einstellen mit DEPC-Wasser auf 500 ml auffüllen
1x MOPS-Puffer	950 ml Aqua dest 50 ml 20x MOPS
100% Percoll für die Aufreinigung von Leukozyten aus Darmgewebe	50 ml Percoll 4,33 ml 10x HBSS 500 µl HEPES-Puffer (1M) 220 µl HCl (1N)
75% Percoll für die Aufreinigung von Leukozyten aus Darmgewebe	Bei Gebrauch frisch anzusetzen: 1,5 ml 100% Percoll 0,5 ml HBSS (1x)
45% Percoll für die Aufreinigung von Leukozyten aus Darmgewebe	Bei Gebrauch frisch anzusetzen: 3,6 ml 100% Percoll 4,4 ml HBSS (1x)
RLT-Puffer + 2-ME	100 ml RLT-Puffer 1 ml 2-ME
RNA-Gel	2,5 g Agarose 190 ml DEPC-Wasser 12,5 ml 20x MOPS unter Rühren zum Kochen bringen unter dem Abzug auf 60°C abkühlen lassen 44 ml 37% Formaldehyd zugeben unter 50°C in vorbereitete Gelkammer gießen
RNA-Probenpuffer	10 ml Formamid 3,5 ml 37% Formaldehyd 1 ml 20x MOPS

	0,8 ml Bromphenolblau 0,2 g Ficoll auf 20 ml mit Aqua dest. auffüllen in 1ml Portionen aliquotieren, bei -20°C lagern vor Benutzung: 5 µl Ethidiumbromid pro ml Puffer frisch dazugeben
RPMI (5%) Medium (RPMI/5) RPMI (10%) Medium (RPMI/5)	RPMI 1640 Medium 5% bzw. 10% FCS 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
RPMI complete Medium (cRPMI)	RPMI 1640 Medium 10% FCS 2mM L-Glutamin 10mM HEPES-Puffer 50 µM 2-Mercaptoethanol 1mM Natrium-Pyruvat 1% MEM-NEAA 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
RPMI/2-ME	RPMI 1640 Medium 10% FCS 50 µM 2-ME 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
RPMI/HEPES	RPMI 1640 Medium 2% FCS 20 mM HEPES-Puffer 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
Trypanblau Lösung	0,16% Trypanblau auf Aqua dest
Waschpuffer für IHC	Bei Gebrauch frisch anzusetzen: 100 ml Waschpuffer-Konzentrat (10x) 900 ml Aqua dest.

Tabelle 3.2: Medien und Lösungen

3.1.3 Antikörper für die Durchflusszytometrie (FACS)

Spezifität	Isotyp	Klon	Herkunft	Konjugat	Hersteller
Anti-Biotin	Rekombinant Human IgG1	REA746	Human	PerCP, APC, VioBlue	Miltenyi, Bergisch- Gladbach
CD4	IgG2a	RM4-5	Ratte	APC, PB	BioLegend, Eching
CD8α	IgG2a	53-6.7	Ratte	FITC	Miltenyi, Bergisch- Gladbach
CD8α	IgG2a	53-6.7	Ratte	PerCP	BD, Heidelberg
CD8β	IgG1	53-5.8	Ratte	PB	BioLegend, Eching
CD11b	IgG2a	M1/70	Ratte	FITC	BioLegend, Eching

CD11b	IgG2a	M1/70	Ratte	PE, PE-Cy7, PerCP-Cy5.5	BD, Heidelberg
CD11c	IgG	N418	Hamster	eFluor450, PerCP	eBioscience, Frankfurt
CD11c	IgG1	HL3	Hamster	PerCP-Cy5.5	BD, Heidelberg
CD16/32	IgG2a	93	Ratte	Purified	BioLegend, Eching
CD19	IgG2a	1D3	Ratte	FITC, PE-Cy7	BD, Heidelberg
CD19	IgG2a	6D5	Ratte	PE, APC-Cy7	BioLegend, Eching
CD21	IgG2a	7E9	Ratte	APC	BioLegend, Eching
CD23	IgG2b	B3B4	Ratte	PE	BioLegend, Eching
CD24	IgG2b	M1/69	Ratte	PE-Cy7	BioLegend, Eching
CD25	IgG1	PC61	Ratte	PE, PE-Cy7	BD, Heidelberg
CD25	IgG1	PC61	Ratte	APC	BioLegend, Eching
CD43	IgG2b	S11	Ratte	PE	BioLegend, Eching
CD44	IgG2b	IM7	Ratte	eFluor450	eBioscience, Frankfurt
CD45	IgG2b	30F-11	Ratte	FITC, PE	BD, Heidelberg
CD45R/ B220	IgG2a	RA3-6B2	Ratte	PE-Cy7	BioLegend, Eching
CD45R/ B220	IgG2a	RA3-6B2	Ratte	FITC, PB	BD, Heidelberg
CD62L	IgG2a	MEL-14	Ratte	APC	BD, Heidelberg
CD62L	IgG2a	MEL-14	Ratte	PE-Cy7	eBioscience, Frankfurt
CD90.1	IgG1	OX-7	Maus	PerCP	BD, Heidelberg
CD90.1	IgG1	OX-7	Maus	PE-Cy7	eBioscience, Frankfurt
CD90.2	IgG2a	53-2.1	Ratte	PB	BioLegend, Eching
CD103	IgG	2E7	Hamster	FITC, APC	eBioscience, Frankfurt
CD117/c-kit	IgG2b	2B8	Ratte	PE-Cy7	BD, Heidelberg
CD127	IgG2a	A7R34	Ratte	FITC	eBioscience, Frankfurt
CD197/ CCR7	IgG2a	4B12	Ratte	PE-Cy7	eBioscience, Frankfurt
CD199/ CCR9	IgG2a	CW-1.2	Maus	APC	BioLegend, Eching
FLT3	IgG2a	A2F10	Ratte	PE	eBioscience, Frankfurt
Foxp3	IgG2a	FJK-16s	Ratte	FITC, PE, APC, PB	eBioscience, Frankfurt

Gr-1	IgG2b	RB6-8C5	Ratte	APC	BD, Heidelberg
H-2K^b	IgG2a	AF6-88.5	Maus	FITC, PE, Biotin	BioLegend, Eching
Helios	IgG	22F6	Hamster	PE	BioLegend, Eching
IFN-γ	IgG1	XMG1.2	Ratte	APC	BD, Heidelberg
IgD	IgG2a	11-26c.2a	Ratte	FITC	BD, Heidelberg
IgM	IgG2a	II/41	Ratte	Biotin	BD, Heidelberg
IL-2	IgG2b	JES6-5H4	Ratte	PE	BD, Heidelberg
IL-6	IgG1	MP5-20F3	Ratte	PE	BD, Heidelberg
IL-10	IgG2b	JES5-16E3	Ratte	APC	BioLegend, Eching
IL-17A	IgG1	TC11-18H10	Ratte	PE	BD, Heidelberg
Ki-67	IgG2a	SolA15	Ratte	eFluor660	eBioscience, Frankfurt
Lineage Cocktail	Lineage cell depletion kit			Biotin	Miltenyi, Bergisch-Gladbach
LPAM-1	IgG2a	DATK32	Ratte	PE	BD, Heidelberg
Ly6A/Sca-1	IgG2a	D7	Ratte	PB	BioLegend, Eching
Ly6C	IgG2c	HK1.4	Ratte	PB	BioLegend, Eching
Ly51/BP-1	IgG2a	6C3	Ratte	Biotin	BioLegend, Eching
TCRβ	IgG2a	H57-597	Hamster	PE, APC, PE-Cy7	BD, Heidelberg
TCRβ	IgG	H57-597	Hamster	APC-Cy7	BioLegend, Eching
TCRβ	Rekombinant Human IgG1	REA318	Human	APC	Miltenyi, Bergisch-Gladbach
TCR$\gamma\delta$	IgG	GL3	Hamster	APC	eBioscience, Frankfurt
TER-119	IgG2b	Ter-119	Ratte	APC	BioLegend, Eching
TNF	IgG1	MP6-XT22	Ratte	APC	BD, Heidelberg

Tabelle 3.3: Antikörper für die Durchflusszytometrie

3.1.4 Kompensationsbeads

Name	Hersteller
Anti-mouse BD CompBeads	BD, Heidelberg
MACS Comp Bead Kit, anti-REA	Miltenyi, Bergisch-Gladbach

Tabelle 3.4: Kompensationsbeads

3.1.5 Primärantikörper für die Immunhistochemie

Spezifität	Isotyp	Herkunft	Hersteller
Lysozym	IgG	Kaninchen	Dako, Jena

Tabelle 3.5: Primärantikörper für die Immunhistochemie

3.1.6 Sekundärantikörper für die Immunhistochemie

Name	Spezifität	Hersteller
Histofine Simple Stain mouse MAX PO	Kaninchen	Medac, Wedel

Tabelle 3.6: Sekundärantikörper für die Immunhistochemie

3.1.7 Magnetische Beads

Name	Hersteller
Anti-PE Microbeads	Miltenyi, Bergisch-Gladbach
Anti-PE Microbeads UltraPure	Miltenyi, Bergisch-Gladbach
Anti-mouse CD4 Microbeads	Miltenyi, Bergisch-Gladbach
Anti-mouse CD45 Microbeads	Miltenyi, Bergisch-Gladbach
Anti-mouse CD90.2 Microbeads	Miltenyi, Bergisch-Gladbach
Anti-rat/hamster BD CompBeads	BD, Heidelberg
Treg Expansion Kit, mouse	Miltenyi, Bergisch-Gladbach

Tabelle 3.7: Magnetische Beads

3.1.8 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
5 ml FACS-Röhrchen (steril, unsteril)	Falcon/BD, Franklin Lakes, NJ USA
96-Loch-Rundbodenplatten	Corning/Costar, NY USA
24-Loch-Flachbodenplatten	Corning/Costar, NY USA
Objektträgergestell für IHC	Thermo Fisher, MA USA

Deckgläser (20 x 26 mm, 24 x 40 mm)	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Einbettkassetten	Labonord, Mönchengladbach
Einwegskalpell	Feather, Osaka, Japan
Gelkammer	Carl Roth, Karlsruhe
GentleMACS C-Tubes	Miltenyi, Bergisch-Gladbach
GentleMACS M-Tubes	Miltenyi, Bergisch-Gladbach
Gewebeschwamm	Labonord, Mönchengladbach
Kanülen (0,4 mm; 0,9 mm)	BD, Heidelberg
Klebefolie	Packard, Niederlande
Kombitips	Eppendorf, Hamburg
MACS-Separations-Säulen (LS, LD)	Miltenyi, Bergisch-Gladbach
Neubauer Zählkammer	Carl Roth, Karlsruhe
Petrischalen (100 x 15 mm)	BD, Franklin Lakes, NJ USA
Pipetten (2, 5, 10, 25, 50 ml)	Corning/Costar, NY USA
Quiashredder	Quiagen, Hilden
Spritzen (1, 10 ml)	BD, Heidelberg
Zellsiebe (30 µm)	Miltenyi, Bergisch-Gladbach
Zellsiebe (70, 100 µm)	BD, Heidelberg
Zentrifugationsröhrchen (15, 50 ml)	Falcon/BD, Franklin Lakes, NJ USA

Tabelle 3.8: Verbrauchsmaterialien

3.1.9 Geräte

Gerät	Hersteller
Absaugpumpe	KNF Lab, Freiburg
AutoMACS® Pro-Separator	Miltenyi, Bergisch-Gladbach
BD FACSAria™ Hochgeschwindigkeitszellsorter	BD, Heidelberg
BD™ LSR II Durchflußzytometer	BD, Heidelberg
Bestrahlungsgerät (Primus II)	Siemens, München
Bestrahlungsgerät (IBL437C)	CISbio International, Gif-Sur-Yvette, Frankreich
GentleMACS™ Dissociator	Miltenyi, Bergisch-Gladbach

Heizblock	Haep Labor Consult, Bovenden
Inkubatoren	Heraeus, Hanau
MACS® Multistand	Miltenyi, Bergisch-Gladbach
MACSiMAG Magnet	Miltenyi, Bergisch-Gladbach
Mastercycler egradient S	Eppendorf, Hamburg
Megafugen Zentrifuge	Heraeus, Hanau
Midi-MACS™ (Magnet)	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach
Mikroskop	Leitz, Wetzlar
Mikrotom Frigucot 2800-E	Reichert Jung, Wetzlar
Nanodrop	Thermo Fisher, Massachusetts
Rotor Sample Mixer	Invitrogen/Dynal, Oslo
Sprout Minizentrifuge	Biozym, Oldendorf
Sterilbank	Heraeus, Hanau
Thermocycler PTC-200	MJI Research, Waltham, MA USA
Tischzentrifuge	Heraeus, Hanau
Typhoon 9200 Imager	GE Molecular dynamics, Amersham, UK

Tabelle 3.9: Geräte

3.1.10 Versuchstiere

Mausstamm	Herkunft
BALB/c	Charles River, Sulzfeld
BALB/c Thy1.1	Eigene Zucht, Ursprung: Mainz (U. Sahin)
C57BL/6	Charles River, Sulzfeld
CB6F1 (BALB/c x C57BL/6)	Charles River, Sulzfeld

Tabelle 3.10: Versuchstiere

3.1.11 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden entweder mit der Primer 3 Software (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) selbst erstellt (s), aus der Literatur entnommen (L) oder freundlicherweise von Jamie Ferraras (JF) Labor (Hess Center for Science and Medicine, NY USA) bereitgestellt und von der Firma Metabion in Martinsried hergestellt. Die Schmelztemperatur (*Annealing*-Temperatur) der Primer betrug ~ 60°C. (F: *Forward*, R: *Reverse*).

Name	Design	Literatur	Sequenz (5' → 3')
CCL2 F	L	Power et al. (216)	GCCTGCTGTTACAGTTGCC
CCL2 R	L	Power et al. (216)	AGCCTACTCATTGGGATCATCTTGCT
IL-10 F	L	Matsushita et al. (217)	GGTTGCCAAGCCTTATCGGA
IL-10 R	L	Matsushita et al. (217)	ACCTGCTCCACTGCCTTGCT
IL-6 F	s		GAGGATACCACTCCCAACAGACC
IL-6 R	s		AAGTGCATCATCGTTGTTCATACA
IL-17A F	JF		GCTCCAGAAGGCCCTCAGA
IL-17A R	JF		AGCTTTCCCTCCGCATTGA
IFN-γ F	L	Jupelli et al. (218)	TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA
IFN-γ R	L	Jupelli et al. (218)	TGGCTCTGCAGGATTTTCATG
MIP-2 F	s		GGCTGTTGTGGCCAGTGAA
MIP-2 R	s		GCTTCAGGGTCAAGGCAAAC
Reg3γ F	JF		ATGGCTCCTATTGCTATGCC
Reg3γ R	JF		GATGTCCTGAGGGCCTGTT
TNF F	L	Huppert et al. (219)	CATCTTCTCAAATTCGAGTGACAA
TNF R	L	Huppert et al. (219)	TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC

Tabelle 3.11: Oligonukleotide

3.2 Methoden

3.2.1 Ermittlung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl primär isolierter Zellen aus diversen Organen sowie *in vitro* kultivierter Zellen wurde eine Neubauer Zählkammer (Tabelle 3.8) verwendet. Zellen, die keine Erythrozyten enthielten, wurden in 0,16 % Trypanblaulösung (Tabelle 3.2) verdünnt. Erythrozyten-haltige Zellsuspensionen wurden in Türks-Lösung (Tabelle 3.1) lysiert. Beide Lebend-tot-Farbstoffe färben tote Zellen aufgrund ihrer fehlenden Membranintegrität blau, wodurch eine klare Unterscheidung lebender von toten Leukozyten erzielt werden kann.

Die Zellzahl wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Anzahl lebender Zellen}}{\text{Anzahl ausgezählter Quadranten}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Kammerfaktor} = \frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}}$$

3.2.2 Aufarbeitung muriner Primärzellen

3.2.2.1 Venöse Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte im Tierstall, indem etwa 4-6 Tropfen venöses Blut aus der lateralen Schwanzvene entnommen und in einem 5 ml Röhrchen (4 ml DPBS + 10 µl Heparin) aufgefangen wurden. Das heparinisierte Blut wurde anschließend resuspendiert, auf die gewünschte Anzahl an FACS-Röhrchen verteilt und bei 300 g und 4°C 8 min zentrifugiert. Zur Erythrozyten-Lyse wurde je Röhrchen 1 ml 1x ACK-Puffer (Tabelle 3.2) auf das resuspendierte Zellpellet gegeben und 8 min bei RT inkubiert. Je nach Güte der Lyse (und der Blutmenge) musste eventuell eine weitere ACK-Lyse durchgeführt werden. Ansonsten folgten zwei Waschschrte mit DPBS (Tabelle 3.1), in welchem das Pellet je in 100 µl DPBS aufgenommen, auf ca. 3 ml aufgefüllt und bei 300 x g und 4°C 6 min zentrifugiert wurde.

3.2.2.2 Isolation von Leukozyten aus dem Knochenmark

Im Tierlaboratorium wurden Versuchstiere durch zervikale Dislokation getötet und die Femora und Tibiae der Hinterläufe entnommen. Diese wurden in noch geschlossenem Zustand von anhängenden Sehnen und Muskelgewebe befreit und in 50 ml-Röhrchen mit RPMI-Medium (Tabelle 3.1) überführt. Unter sterilen Bedingungen wurden die Femora und Tibiae in eine sterile, vorgekühlte Petrischale mit RPMI/5 (Tabelle 3.2) überführt, getrennt und an beiden Enden geöffnet, sodass das Knochenmark mit Hilfe einer Spritze mit 0,4 mm Kanüle und RPMI/5 Medium ausgespült werden konnte. Die Zellen wurden anschließend mit einer 5 ml Pipette mehrfach auf und ab pipettiert und so in Suspension gebracht. Zur Entfernung größerer Zellaggregate und Knochensplitter wurde die Suspension über einen 70 µm-Zellsieb in ein 50 ml-Röhrchen filtriert und die Petrischale zweimal mit RPMI/5 Medium nachgespült. Die Zellen wurden zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 2 ml RPMI/5 Medium resuspendiert. Anschließend erfolgte eine Erythrozytenlyse durch Zugabe von 3 ml 1x ACK-Puffer (Tabelle 3.2) für 1 min bei RT. Die Reaktion wurde mit 10 ml RPMI/10 (Tabelle 3.2) abgestoppt, die Zellen auf 50 ml mit RPMI/10 aufgefüllt und zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen zur Entfernung eventuell durch die ACK-Lyse entstandener Zellaggregate erneut über ein 70 µm-Zellsieb filtriert, abzentrifugiert, zur weiteren Verwendung in 1 ml RPMI/10 aufgenommen und in Türks-Lösung (Tabelle 3.1) verdünnt gezählt. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 300 x g und 4°C für 10 min.

3.2.2.3 Isolation von Leukozyten aus der Milz

Die Entnahme der Milz erfolgte in den Tierlaboratorien unter aseptischen Bedingungen. Die Milz wurde in eine sterile, vorgekühlte Petrischale mit 5 ml RPMI/5 (Tabelle 3.2) überführt, unter Zuhilfenahme zweier Pinzetten auf einer Seite geöffnet und vorsichtig ausgestrichen bis nur noch eine leere Bindegewebshülle übrig war. Die Zellen wurden anschließend mit einer 5

ml Pipette mehrmals auf und ab pipettiert und so in Suspension gebracht. Zur Entfernung größerer Zellaggregate und residualen Bindegewebes wurde die Suspension über einen 70 µm-Zellsieb in ein 50 ml-Röhrchen filtriert und die Petrischale zweimal mit RPMI/5 Medium nachgespült. Die Zellen wurden zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 2 ml RPMI/5 Medium resuspendiert. Anschließend erfolgt eine Erythrozytenlyse mit 3 ml 1x ACK-Puffer (Tabelle 3.2) für 1,5 min bei RT. Die Reaktion wurde mit 10 ml RPMI/10 (Tabelle 3.2) abgestoppt, die Zellen auf 50 ml mit RPMI/10 aufgefüllt und zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen zur Entfernung eventuell durch die ACK-Lyse entstandener Zellaggregate erneut über einen 70 µm-Zellsieb filtriert, zentrifugiert, zur weiteren Verwendung in 1 ml RPMI/10 aufgenommen und in Türks-Lösung (Tabelle 3.1) verdünnt gezählt. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 300 x g und 4°C für 10 min.

3.2.2.4 Isolation von Leukozyten aus Dick- und Dünndarm

Für die Isolation von Leukozyten aus gastrointestinalem Gewebe wurden Colon und Dünndarm nach aseptischer Entnahme getrennt aufgearbeitet und die Peyers Patches (PP) des Dünndarmes entfernt. Die Gewebe wurden danach in Petrischalen mit gekühltem RPMI/HEPES-Medium (Tabelle 3.2) überführt, die Darmabschnitte längs aufgeschnitten und der Darminhalt durch vorsichtiges Schwenken ausgespült. Das Gewebe wurde über ein Aluminiumsieb abgeschüttet, mit gekühltem DPBS (Tabelle 3.1) nachgespült, in 1-3 cm lange Stücke geschnitten und in 14 ml Polystyrenröhrchen mit je 13 ml HBSS/EDTA (Tabelle 3.2) und 1mM DTT (Tabelle 3.1) überführt. Diese wurden zweimal für je 15 min bei 37°C in einem Rotator (Tabelle 3.9) geschwenkt. Dies führt zur Lockerung des Epithelzellverbandes und der Entfernung des Mukus, sodass die intraepithelialen Leukozyten (IEL) herausgelöst wurden. Nach jedem Rotationsschritt wurden die Gewebestücke über einen 100 µm Filter in ein 50 ml Röhrchen gefiltert, die so herausgelösten IEL mit RPMI/10 (Tabelle 3.2) gewaschen und bis zur weiteren Aufreinigung auf Eis gelagert. Nachdem dieser ‚Vorverdau‘ beendet war, wurden die Gewebefragmente in HBSS-Medium ohne Zusatz von EDTA (Tabelle 3.1) gewaschen, über ein Aluminiumsieb abgeschüttet und noch einmal mit DPBS gewaschen, um sämtliche Reste des Vorverdaus zu entfernen. Die Gewebestücke wurden in die Verdaulösung (DMEM farblos mit 25 µg/ml LiberaseTM und 0,5 mg/ml DNase I, alle Tabelle 3.1) überführt, mit einer Schere mechanisch dissoziiert und für weitere 30 min bei 37°C im Rotator inkubiert. Anschließend erfolgte eine mechanische Disruption mittels des GentleMACS Systems (Programm m_intestine 1). Die auf diese Weise enzymatisch herausgelösten Lamina propria Leukozyten (LPL) sind im Überstand enthalten, der gefiltert (100 µm) und mit RPMI/2-ME (Tabelle 3.2) gewaschen wurde. Die weitere Anreicherung der Leukozyten erfolgte nach Optimierung der Isolierungsmethode wie folgt. Für IEL und LPL (Dünndarm) wurde ein Percoll-Gradient (45% Percoll unterschichtet mit 75% Percoll, 1170 x g, 20 min, RT, ohne Bremse, 100% Percoll-Lösung und Verdünnungen siehe Tabelle 3.2) durchgeführt. Die Anreicherung

der LPL (Dickdarm) erfolgte nach Markierung der Zellen mit magnetischen anti-CD45-Partikeln (Tabelle 3.7) für 40 min im Kühlschrank (Prinzip siehe 3.2.3) über den AutoMACS-Separator (Programm POSSEL in 1 ml Gesamtvolumen). Alle Populationen wurden danach einmal gewaschen (420 g, 10 min, 4°C), in RPMI/10 resuspendiert und mit Trypanblau (Tabelle 3.2) gezählt.

3.2.2.5 Isolation von Leukozyten aus Lymphknoten und Peyers Patches

Die Peyers Patches des Dünndarms sowie mesenteriale, axiale und inguinale Lymphknoten wurden einzeln entnommen, von residualem Fett und Bindegewebe befreit, durch ein 70 µm Zellsieb in ein 15 ml Röhrchen gedrückt und dieses mit RPMI/5 (Tabelle 3.2) nachgespült. Die Zellsuspension wurde einmal (PP eventuell zweimal) bei 300 x g, 10 min, 4°C gewaschen und in Trypanblau (Tabelle 3.2) gezählt.

3.2.3 Magnetbasierte Zellanreicherung oder -depletion

Das MACS-System der magnetbasierten Zellanreicherung oder -depletion macht sich magnetische, Antikörper-gebundene Eisenpartikel (Microbeads) zu Nutze, die eine Trennung markierter Zellen von nicht-markierten Zellen in einem magnetischen Feld ermöglichen. Einzelsuspensionen von Primärzellen gewünschter Organe wurden pro 1×10^7 Zellen in 90 µl FACS-Puffer (Tabelle 3.2) aufgenommen, mit je 10 µl/ 1×10^7 Zellen Antigen-spezifischer magnetischer Beads (siehe Tabelle 3.7) für 15 min bei 4°C gefärbt, über ein 70 µm Zellsieb filtriert und gewaschen (300 x g, 4°C für 10 min). Anschließend erfolgte über das Magnetfeld des Säulensystems die Anreicherung (LS-Säule) oder Depletion (LD-Säule, beide siehe Tabelle 3.8) der gewünschten Populationen.

3.2.3.1 Magnetbasierte Separation

Für die Positivselektion von Zellpopulationen wurden LS-Säulen in das Magnetfeld eingebracht, mit 3 ml MACS-Puffer (Tabelle 3.2) äquilibriert und die Zellen in 500 µl je 1×10^8 Zellen MACS-Puffer auf die LS-Separationssäule gegeben, wodurch die magnetisch markierten Zellen zurückgehalten wurden, während die nicht-markierten Zellpopulationen im Eluat erschienen (Negativfraktion). Die Säule wurde dreimal mit je 3 ml MACS-Puffer gespült, aus dem Magnetfeld entfernt und in ein steriles 15 ml Röhrchen überführt. Anschließend wurde die Positivfraktion mittels 5 ml MACS-Puffers und des mitgelieferten Spritzenkolbens in das 15 ml Falcon-Röhrchen eluiert.

3.2.3.2 Magnetbasierte Depletion

Für die effiziente Depletion von Zellpopulationen wurden LD-Depletionssäulen verwendet, die eine sehr kompakte Säulenstruktur aufweisen. Diese wurden ins magnetische Feld eingebracht und mit 2 ml MACS-Puffer (Tabelle 3.2) äquilibriert. Die Zellen wurden in einer

Konzentration von 500 µl MACS-Puffer pro 1×10^8 Zellen über die Säule gegeben und die Säule anschließend zweimal mit je 1 ml MACS-Puffer gespült. Im Eluat befanden sich die von den gewünschten Antigenen depletierten Zellen, die weiter prozessiert werden konnten. Aufgrund der kompakten Säulenstruktur der LD-Säule können die depletierten Zellpopulationen nur schwer gelöst werden, weshalb sie nicht weiterverwendet wurden.

3.2.4 Durchflusszytometrische Messungen

Die Durchflusszytometrie (FACS, *fluorescence activated cell sorting*) dient der qualitativen und quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen, intrazellulären Proteinen sowie der DNA, bei der man sich die spezifische Bindung von fluoreszenzmarkierten Antikörpern (siehe Tabelle 3.3) an das jeweilige Antigen zu Nutze macht. Das in dieser Arbeit verwandte Gerät (LSR II, BD, siehe Tabelle 3.9) ist mit vier Lasern ausgerüstet, die unterschiedliche Wellenlängen anregen (blau: 488 nm, rot: 633 nm, violett: 403 nm und UV: 355 nm). Im blauen Laser werden die Fluorochrome Fluorescein isothiocyanate (FITC), Phycoerythrin (PE), Peridinin chlorophyll (PerCP/PerCP-Cy5.5) und PE-Cy7 angeregt, während sich der rote Laser für die Farbstoffe Allophycocyanin (APC), eFluor 660 und APC-Cy7 eignet. Im violetten Laser können die Fluorochrome Pacific Blue (PB) sowie eFluor450 gemessen werden, im UV-Laser wird der DNA-Farbstoff DAPI detektiert. Da die Emmissionsspektren der Fluorochrome zum Teil überlappen können, musste über optische Interferenzfilter eine rechnerische Korrektur, die sogenannte Kompensation, erfolgen. Dafür wurden je nach Antikörperspezifität und -herkunft unterschiedliche Kompensationsbeads verwendet (siehe Tabelle 3.4). Es wurde je ein Tropfen der Kompensationsbeads pro 100 µl FACS-Puffer (Tabelle 3.2) mit der doppelten der für den jeweiligen Antikörper titrierten Menge für 20 min bei 4°C gefärbt. Nach einem Waschschrift (300 x g, 4°C, 5 min) wurden die Beads in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen. Die hierfür verwendeten Antikörper, die für ihr jeweiliges Fluorochrom eine sehr hohe Fluoreszenzintensität aufweisen, sind in Tabelle 3.12 zusammengefasst (weitere Spezifikationen siehe Tabelle 3.3).

Fluorochrom	FITC	PE	PerCP	APC	PE-Cy7	PB	APC-Cy7
Antikörper	CD4	CD4	CD8α	CD4	CD19	CD4	CD3

Tabelle 3.12: Antikörper für die Kompensation

Einzelne problematische Antikörper und abweichend konjugierte Antikörper (wie zum Beispiel PerCP-Cy5.5, eFluor450 oder eFluor660) wurden separat kompensiert. Zusätzlich wurden jeweils ungefärbte Primärzellen (meist Milzzellen) und negative Kontrollbeads in FACS-Röhrchen mit je 200 µl FACS-Puffer mitgeführt. In der verwendeten BD FACS Diva Software wurden die Kompensationskontrollen für die einzelnen Fluorochrome sowie die ungefärbten Kontrollen automatisch erstellt und nach Aufnahme der gefärbten Einzelproben automatisch

berechnet. Eine Besonderheit bei der Kompensation bestand darin, dass die Verstärkung der einzelnen Parameter anhand der Autofluoreszenz der Primärzellen eingestellt wurde, jedoch schlussendlich die negativen Kontrollbeads, die eine höhere Autofluoreszenz im violetten Kanal aufwiesen, mit den so gesetzten Einstellungen als Negativ-Kontrolle aufgenommen wurden. Dies ermöglichte eine Verrechnung der Fluoreszenzintensität der gefärbten Beads mit der Autofluoreszenz der negativen Kontrollbeads ohne die Autofluoreszenz ungefärbter Primärzellen zu verzerren. Die Auswertung der durchflusszytometrisch analysierten Zellen erfolgte mit dem Programm FlowJo (Treestar, Oregon, USA).

3.2.4.1 Antikörperfärbung von Oberflächenmolekülen

Alle Inkubationsschritte während der Färbung von Zellen auf Oberflächen- und/oder intrazelluläre Marker wurden auf Eis und zum Schutz der Fluorochrome unter Vermeidung direkter Lichteinstrahlung durchgeführt.

Es wurden in der Regel 1×10^6 Leukozyten pro Färbung in 100 μ l FACS-Puffer (Tabelle 3.2) eingesetzt. Dazu wurden die Zellen in ein mit FACS-Puffer (Tabelle 3.2) gefülltes FACS-Röhrchen überführt und abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 50 μ l FACS-Puffer mit dem Fc-Rezeptor blockierenden Antikörpern anti-CD16/CD32 (1 μ g/ 1×10^6 Zellen pro 100 μ l, siehe Tabelle 3.3) resuspendiert und für 5 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden titrierte Mengen an fluoreszenzmarkierten Antikörpern in Form eines Cocktails à 50 μ l auf die Zellsuspension gegeben und für weitere 20 min bei 4°C inkubiert. Danach wurden überschüssige Antikörper durch einen Waschschrift mit FACS-Puffer entfernt und die Zellen in 200 μ l FACS-Puffer resuspendiert. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 300 x g, 4°C, 5 min. Kurz vor der Messung wurde 1 ng/ml DAPI (Tabelle 3.1) hinzugegeben, um lebende von toten Zellen zu unterscheiden.

3.2.4.2 Färbung von intrazellulären Molekülen

Intrazellulärfärbungen wurden nach Abschluss der Oberflächenfärbung (siehe 3.2.4.1) durchgeführt und nach Bedarf für zytoplasmatische oder intranukleäre Färbungen unterschiedlich angefertigt.

Für die lebend/tot Unterscheidung in fixierten Proben wurden die Zellen vor der Oberflächenfärbung einmal mit DPBS (Tabelle 3.1) gewaschen, das Zellpellet resuspendiert, in 1 ml DPBS aufgenommen und 1 μ l des Live/Dead-Farbstoffes (Tabelle 3.1) hinzugegeben. Die Zellen wurden für 30 min bei 4°C inkubiert, danach einmal in FACS-Puffer (Tabelle 3.2) gewaschen und wie beschrieben (3.2.4.1) auf Oberflächenmarker gefärbt. Für zytoplasmatische Marker wurden die Zellen anschließend in 250 μ l Cytofix/Cytoperm (Tabelle 3.1) resuspendiert und für 20 min bei 4°C permeabilisiert und fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit 1x BD Perm/Wash-Puffer (Tabelle 3.1), der den permeabilisierten Zustand der Zellen aufrechterhält,

wurden die Zellen in 100 µl Perm/Wash-Puffer resuspendiert, die Antikörper für intrazelluläre Antigene hinzugegeben und für 30 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden zwei weitere Waschschrte mit BD Perm/Wash-Puffer durchgeführt und die Zellen in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert. Für die Färbung intranukleärer Marker wurden die Zellen nach der Oberflächenfärbung unter Vortexen in 1 ml Fixierungs/ Permeabilisierungslösung (eBioscience, Tabelle 3.1) resuspendiert und für 30 min bei 4°C permeabilisiert und fixiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit je 2 ml 1x Permeabilisierungspuffer (eBioscience, Tabelle 3.1) gewaschen, in 100 µl Permeabilisierungspuffer aufgenommen und die Antikörper für intranukleäre Antigene zugegeben. Diese wurden für 30 min bei 4°C inkubiert, anschließend wurde mit 2 ml 1x Permeabilisierungspuffer und danach mit FACS-Puffer gewaschen und die Zellen in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 300 x g, 4°C für 5 min.

3.2.4.3 Identifikation von Leukozytenpopulationen

Die einzelnen Leukozytenpopulationen wurden bei der durchflusszytometrischen Analyse über die in Tabelle 3.13 gezeigten Kombinationen von Oberflächen- und intrazellulären Markern identifiziert.

Population	Positivmarker	Ausschlussmarker
αβ-T-Zellen	(CD45 ⁺)TCRβ ⁺	-
DN αβ-T-Zellen	TCRβ ⁺	CD4 ⁻ CD8α ⁻
CD4⁺ αβ-T-Zellen	TCRβ ⁺ CD4 ⁺	CD8α ⁻
CD8⁺ αβ-T-Zellen	TCRβ ⁺ CD8α ⁺	CD4 ⁻
CD4⁺ Tkonv	(TCRβ ⁺)CD4 ⁺	Foxp3 ⁻ (sort: CD25 ⁻)
CD4⁺ Treg	(TCRβ ⁺)CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ (sort:CD25 ^{high})	-
CD62L⁺ Treg (Sort)	CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD62L ⁺	-
CD62L⁻ Treg (Sort)	CD4 ⁺ CD25 ^{high}	CD62L ⁻
CD8αα IEL	(CD45 ⁺)TCRβ ⁺ CD8α ⁺	CD8β ⁻
CD8αβ IEL	(CD45 ⁺)TCRβ ⁺ CD8α ⁺ CD8β ⁺	-
γδ-T-Zellen	(CD45 ⁺)TCRγδ ⁺	TCRβ ⁻
B-Zellen	(CD45 ⁺)CD19 ⁺ (oder B220 ⁺)	(CD11b ⁻ TCRβ ⁻)
Erythropoietische Vorläuferzellen	TER-119 ⁺	CD45 ⁻
LSK-Zellen	c-kit ⁺ Sca-1 ⁺	Lin ⁻
CLP1-Zellen	FLT-3 ⁺ CD127 ⁺	Lin ⁻

CLP2-Zellen	CD127 ⁺	Lin ⁻ FLT-3 ⁻
Hardy Fraktion A	B220 ⁺ CD43 ⁺	BP-1 ⁻ CD24 ⁻
Hardy Fraktion B	B220 ⁺ CD43 ⁺ CD24 ⁺	BP-1 ⁻
Hardy Fraktion C	B220 ⁺ CD43 ⁺ BP-1 ⁺ CD24 ⁺	-
Hardy Fraktion D	B220 ⁺	CD43 ⁻ IgM ⁻ IgD ⁻
Hardy Fraktion E	B220 ⁺ IgM ⁺	CD43 ⁻ IgD ⁻
Hardy Fraktion F	B220 ⁺ IgM ⁺ IgD ⁺	CD43 ⁻
Unreife B-Zellen (Milz)	CD19 ⁺	CD21 ⁻ CD23 ⁻
Follikuläre B-Zellen (Milz)	CD19 ⁺ CD21 ^{dim} CD23 ⁺	-
Marginalzonen B-Zellen (Milz)	CD19 ⁺ CD21 ^{high}	CD23 ⁻
Myeloide Zellen	(CD45 ⁺)CD11b ⁺	-
Myeloide Suppressorzellen	(CD45 ⁺)CD11b ⁺ Gr-1 ^{dim} Ly6-C ⁺	-
Neutrophile Granulozyten	(CD45 ⁺)CD11b ⁺ Gr-1 ⁺	-
Dendritische Zellen	CD45 ⁺ CD11b ⁺ CD11c ⁺	-

Tabelle 3.13: Durchflusszytometrische Identifikation von Leukozytenpopulationen

3.2.5 Isolation und Sortierung muriner regulatorischer und konventioneller T-Zellen für die *in vitro* Expansion

Für die Isolation von CD4⁺ Treg- und Tkonv-Zellen wurden Einzelzellsuspensionen von Milzzellen (siehe Abschnitt 3.2.2.3) mittels magnetischer Zellseparation angereichert und anschließend durchflusszytometrisch sortiert.

3.2.5.1 Magnetbasierte Zellanreicherung von murinen CD25⁺ Milzzellen

Ähnlich wie im Abschnitt 3.2.3 beschrieben, wurden magnetbasierte Separationstechnologien zur Anreicherung CD25-exprimierender Zellen angewandt. Einzelsuspensionen von Milzzellen wurden pro 1×10^7 Zellen in 100 µl FACS-Puffer (Tabelle 3.2) aufgenommen, mit 1 µl à 1×10^7 Zellen PE-anti-CD25 (Tabelle 3.3) für 20 min bei 4°C gefärbt und danach mit FACS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 80 µl FACS-Puffer pro 1×10^7 Zellen resuspendiert, mit 20 µl anti-PE-Microbeads bzw. anti-PE-UltraPure Microbeads à 1×10^7 Zellen (Tabelle 3.7) für 15 min bei 4°C inkubiert, über ein 70 µm Zellsieb filtriert und mit FACS-Puffer gewaschen. Der Säulenlauf erfolgte wie in Abschnitt 3.2.3.1 beschrieben und trennte die CD25-Positivfraktion von der CD25-Negativfraktion.

Beide Zellpopulationen wurden anschließend für die hochreine Sortierung im Durchflusszytometer in 100 µl FACS-Puffer pro 4×10^6 Zellen aufgenommen und mit 1 µl PB-anti-CD4

und 2,3 µl APC-anti-CD62L Antikörpern/4 x 10⁶ Zellen für 20 min bei 4°C gefärbt (siehe Tabelle 3.3; Vorgehen siehe 3.2.4.1). Danach wurde die CD25-Positivfraktion in die Subpopulationen CD4⁺CD25^{high}CD62L⁺ Treg bzw. CD4⁺CD25^{high}CD62L⁻ Treg und die CD25-Negativfraktion in hochreine CD4⁺CD25⁻ Tkonv sortiert.

3.2.5.2 Zellsortierung von regulatorischen und konventionellen T-Zellen mittels Durchflusszytometrie

Die fluoreszenzbasierte Zellsortierung ist eine Spezialanwendung der Durchflusszytometrie und wurde mit dem Gerät FACSAria IIU (Tabelle 3.9) durchgeführt. Dieser ermöglicht eine Vereinzelung von Zellen in Tröpfchen des Hüllstrahles und deren anschließende Ablenkung mittels elektrischer Impulse. Die zu sortierenden Zellen wurden für die gewünschten Antigene Fluorochrom-markiert (Ablauf siehe 3.2.5.1) und zum Ausschluss toter Zellen mit PI (Tabelle 3.1) gefärbt. Direkt vor der Sortierung wurden die Zellen über einen 30 µm Zellfilter (Tabelle 3.8) filtriert um Aggregate auszuschließen. Zunächst wurde die mit CD4-PB, CD25-PE und CD62L-APC gefärbten Milzzellen durchflusszytometrisch analysiert und anhand dessen wurden die Sortier-Gates für die jeweiligen Zielzellpopulationen festgelegt. Diese Gates wurden auf die Zellen der CD25-Positiv- und Negativfraktionen übertragen und die Zellen anschließend FACS-sortiert. Nach der Sortierung wurde die Reinheit der Zellprodukte am FACSAria überprüft und betrug regelmäßig > 96 %.

3.2.6 In vitro Methoden

3.2.6.1 Polyklonale Expansion von Treg- und Tkonv-Populationen

Die sortierten CD4⁺ T-Zellpopulationen wurden in einer Konzentration von 1 x 10⁴ Zellen pro 100 µl cDMEM (Tabelle 3.2) pro Vertiefung einer 96-Loch-Rundbodenplatte ausgesät. Die Stimulation der Treg-Zellen erfolgte mit je 4 Beads/Zelle (CD3/CD28 beladene magnetische Partikel, Treg Expansion Kit, siehe Tabelle 3.7) und 2000 U/ml hIL-2 (Proleukin S, Tabelle 3.1), die Stimulation der Tkonv-Zellen mit je 2 Beads/Zelle und 100 U/ml hIL-2. Nach vier Tagen wurden die Treg vorsichtig resuspendiert und mit je 100 µl cDMEM mit 2000 U/ml hIL-2 pro Loch gefüttert. Tkonv erhielten erst je 100 µl cDMEM mit 100 U/ml hIL-2 pro Loch, danach wurden je 100 µl Zellsuspension entnommen, in eine neue Vertiefung der 96-Loch-Rundbodenplatte überführt und pro Lochvertiefung je mit 100 µl cDMEM mit 100 U/ml hIL-2 auf 200 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. An d7 der *in vitro* Kultur wurden die Zellen geerntet, in Trypanblau (Tabelle 3.2) gezählt, je 1 x 10⁶ Treg/ml cDMEM mit 2000 U/ml hIL-2 pro Vertiefung einer 24-Loch-Flachbodenplatte neu ausgesät und mit je 1 Bead/Zelle restimuliert. Tkonv-Zellen wurden in einer Konzentration von 500.000 Zellen/ml cDMEM mit 100 U/ml hIL-2 in einer 24-Loch-Flachbodenplatte ausgesät und ebenfalls mit je 1 Bead/Zelle restimuliert. Je nach Expansionsrate der Zellen wurden zwischen d11 und d12 entweder 500 µl cDMEM mit

hIL-2 ausgetauscht oder die Zellen auf zwei Vertiefungen einer 24-Loch-Flachbodenplatte im Verhältnis 1:1 verteilt. Nach 14 Tagen wurden die Zellen aus den Parallelvertiefungen resuspendiert, geerntet, in einem 50 ml Röhrchen vereint und zur Entfernung der Beads für 2 min in einen Magnetseparator (Tabelle 3.9) gestellt. Dieser lagert die magnetischen Expansionspartikel an der Röhrchenwand an, sodass die von den Beads befreiten Zellen in Suspension abgenommen werden können. Zur Überprüfung des Kulturverlaufs wurden die Zellen an d7 und d14 hinsichtlich ihres Phänotyps durchflusszytometrisch analysiert.

3.2.6.2 Suppressionsassay

Der Suppressionsassay bestimmt die Aktivität regulatorischer T-Zellen in Bezug auf die Inhibition der Proliferation konventioneller T-Zellen. Die dafür benötigten Zellpopulationen wurden aus Einzelzellsuspensionen von Milzzellen generiert.

Zur Isolation von CD4⁺CD25⁻ Zielzellen (*T responder cells*, Tresp) wurden Milzzellen zuerst analog zum Abschnitt 3.2.5.1 mit anti-CD25-PE und anti-PE-Microbeads markiert und über eine Depletionssäule (Vorgehen siehe Abschnitt 3.2.3.2) CD25-depletiert. Die CD25-depletierten Zellen wurden zentrifugiert, in Trypanblau (Tabelle 3.2) gezählt und auf eine Konzentration von 1×10^7 Zellen pro 90 µl FACS-Puffer (Tabelle 3.2) eingestellt. Im Anschluss wurde eine Anreicherung CD4-positiver Zellen unter Verwendung von anti-CD4 Microbeads (Vorgehen siehe Abschnitt 3.2.3.1, Beads siehe Tabelle 3.7) durchgeführt. Dies trennte die CD25⁻CD4⁺-Positivfraktion von der CD25⁻CD4⁻-Negativfraktion. Die Zielpopulation der CD4⁺CD25⁻ Tresp wurde in Trypanblau gezählt. Um die Proliferationsschritte der so generierten Tresp im Suppressionsassay verfolgen zu können, wurden diese mit CFSE (Carboxy-Fluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester) markiert. Dieser Fluoreszenzfarbstoff diffundiert ins Zytosol, kann dies nach enzymatischen Veränderungen im Zellinneren aber nicht mehr verlassen. Bei jeder Proliferationsrunde wird der Farbstoff äquimolar auf die Tochterzellen verteilt, wodurch die Fluoreszenzintensität mit jeder Proliferationsrunde sinkt. Für die CFSE-Färbung wurden je 1×10^7 Zielzellen in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und residuales FCS durch zweimaliges Waschen mit DPBS entfernt. Die Zellen wurden in einem Gesamtvolumen von 1 ml der 1 µM CFSE-Gebrauchslösung (siehe Tabelle 3.2) aufgenommen und für 4 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Färbung wurde durch Zugabe von DPBS/10 abgestoppt, die Zellen in cRPMI gewaschen und in Trypanblau (alle siehe Tabelle 3.2) gezählt.

Simultan wurden autologe APCs durch die Depletion CD90.2-exprimierender T-Zellen hergestellt (Vorgehen siehe Abschnitt 3.2.3.2, Beads siehe Tabelle 3.7). Die so generierten T-Zell-depletierten APCs wurden schließlich in Trypanblau gezählt und im Bestrahlungsgerät IBL437C der klinischen Chemie des Universitätsklinikums Regensburg (Tabelle 3.9) mit 30 Gy bestrahlt, um deren Proliferation im Assay zu unterbinden. Die suppressive Aktivität unterschiedlicher Treg-Subpopulationen wurde vergleichend frisch nach Isolation (Vorgehen

siehe Abschnitt 3.2.5) und nach *in vitro* Expansion (Ablauf siehe Abschnitt 3.2.6.1) getestet. Für den Suppressionsassay wurden in einer 96-Loch-Flachbodenplatte pro Vertiefung je 5×10^4 Tresp zusammen mit 1×10^5 APCs und 0,4 µg/ml anti-CD3ε (Tabelle 3.1) stimuliert. Zusätzlich wurden titrierte Mengen (1:1, 1:4 und 1:16) an frisch-isolierten bzw. *in vitro* expandierten syngen CD62L⁺ Treg, CD62L⁻ Treg oder Tkonv hinzugegeben. Das Gesamtvolumen pro Plattenvertiefung betrug 200 µl Zellen in cRPMI-Medium. Nach 3-4 Tagen wurde die Kokultur geerntet und durchflusszytometrisch analysiert.

3.2.6.3 PMA/Ionomycin-Stimulation für Zytokinanalysen

Zur Untersuchung des Zytokinprofils von Lymphozyten wurden sie mit den Immunstimulatoren PMA und Ionomycin (beide Tabelle 3.1) stimuliert. PMA aktiviert ähnlich wie CD28 die PKC und den MAPK-Signalweg und umgeht so die TCR-Stimulation, während das Ca²⁺-Ionophor Ionomycin einen anhaltenden Ca²⁺-Einstrom gewährleistet. Dabei wird durch die unphysiologisch starke Stimulation das sekretorische Potential der Zelle abgerufen. Die Zellen wurden auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt und für vier bis fünf Stunden in cRPMI-Medium (Tabelle 3.2) mit 20 ng/ml PMA und 1 µM Ionomycin in der Gegenwart von Monensin (Tabelle 3.1) (zur Blockierung der Zytokinsekretion) bei 37 °C in einer 24-Lochplatte inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zuerst auf ihre Oberflächenmarker und danach intrazellulär auf die untersuchten Zytokine gefärbt. Erfolgte eine Färbung zusammen mit Foxp3, so wurden die Reagenzien für intranukleäre Färbungen verwendet (siehe Abschnitt 3.2.4.2).

3.2.7 In vivo Methoden

3.2.7.1 Mauszucht und Haltung

BALB/c Thy 1.1 Mäuse wurden in den Tierlaboratorien des Universitätsklinikums Regensburg unter SPF-Bedingungen (*specific pathogen free*) gezüchtet. Die Käfige beinhalteten sterile Einstreu sowie autoklaviertes Futter und Wasser *ad libitum*. Der Raum wurde stabil bei 22 ± 2 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50-60% gehalten und folgte einem Tag-Nacht-Zyklus von je 12 h. CB6F1-Mäuse (BALB/c x C57BL/6) und BALB/c-Mäuse wurden kommerziell bei Charles River bezogen und für mindestens eine Woche vor KMT an die örtlichen Gegebenheiten adaptiert.

3.2.7.2 Konditionierung und haploidente Knochenmarktransplantation

CB6F1-Empfänger-Mäuse wurden im Alter von 10 Wochen durch Bestrahlung (Primus II, siehe Tabelle 3.9) mit einer letalen Dosis von 13 Gy für die KMT konditioniert. Um die Gewebetoxizität zu minimieren, wurden zwei Einzeldosen à 6,5 Gy im Abstand von vier Stunden verabreicht. Vier Stunden nach der letzten Bestrahlung erfolgte die Transplan-

tation von $2,5 \times 10^6$ haploidenten Knochenmarkzellen (Isolation siehe 3.2.2.2) aus BALB/c-Mäusen mit oder ohne Zusatz von GVHD-induzierenden reifen Spender-T-Zellen in Form von $5,0 \times 10^6$ Milzzellen (Isolation siehe 3.2.2.3) aus BALB/c-Mäusen in RPMI/5-Medium (Tabelle 3.2) durch Injektion in die laterale Schwanzvene.

3.2.7.3 Bewertung der GVHD

Die Bewertung des GVHD-Schweregrades nach KMT erfolgte zweimal wöchentlich anhand des etablierten Bewertungsschemas nach Cooke (220). Berücksichtigt wurden hierbei pathologische Veränderungen des Fells, der Haut, der Körperhaltung, der Mobilität sowie des Körpergewichtes. Jedes Kriterium wurde dabei mit einer Skala von 0-2 bewertet, sodass maximal ein Wert von 10 erreicht werden konnte. Die Tiere wurden aus tierschutzrechtlichen Gründen jedoch bereits bei Erreichen eines maximalen Gesamtwertes von 6 durch zervikale Dislokation getötet.

	Haut	Fell	Körperhaltung	Aktivität	Gewicht
0,5	Schuppung an Pfote und Ohren	Struppiges Fell ventral	Leichte Kyphose, nur in Ruhe	Aktivität reduziert	-
1	Erythem an Schwanz und Anus	Ventrale Querlinien, leicht struppiges Fell dorsal	Leichte Kyphose, auch bei Bewegung	> 50% des Beobachtungszeitraums keine Bewegung	10-25 % Gewichtsverlust
1,5	Offene Läsion	Struppiges Fell > 50% der Oberfläche	Kyphose	Bewegung nur nach Stimulation	-
2	Multiple offene Läsionen	Gesamtes Fell betroffen, Fellverlust	Starke Kyphose, eingeschränkte Beweglichkeit	Keine Bewegung, auch nach Stimulation	> 25% Gewichtsverlust

Tabelle 3.14: GVHD-Bewertungsschema nach Cooke et al. (220)

3.2.8 Gewebefixierung und -färbung für die histopathologische Analyse

Die histopathologische Analyse verschiedener Organe erfolgte entweder zu festgelegten Zeitpunkten nach KMT oder am Versuchsende (ca. d 100 nach KMT). Dabei wurden Haut aus dem Nackenbereich, Colon, Dünndarm und Leber entnommen und für mindestens 24h in Einbettkassetten in 4% Formaldehyd fixiert.

3.2.8.1 Einbetten und Schneiden von Organen

Die Organe wurden von Mitarbeitern des Pathologischen Instituts des Universitätsklinikums Regensburg entwässert und zur weiteren Verarbeitung in Paraffin eingebettet. Die Organe wurden hierfür mittig in einem Metallblock positioniert, mit heißem Paraffin übergossen und auf einer Kühlplatte ausgehärtet. Die eingebetteten Organe wurden vor dem Schneiden mit einem Schlittenmikrotom (Tabelle 3.9) 24h bei -20°C durchgekühlt, anschließend wurden Schnitte mit einer Dicke von 2 μm bzw. 5 μm angefertigt und auf einen Objektträger platziert.

3.2.8.2 Hämatoxylin/Eosin Färbung

Die Hämatoxylin/Eosin Färbung erlaubt eine Unterscheidung der feingeweblichen Strukturen von eingebetteten Geweben. Dafür wurden die Schnitte zuerst anhand der in Tabelle 3.15 dargestellten Schritte entparaffinisiert.

Behandlung/Küvette	Dauer
Xylol I*	10 min
Xylol II*	10 min
Isopropanol 100% I*	2 min
Isopropanol 100% II*	2 min
Isopropanol 96%	2 min
Isopropanol 70%	2 min
VE-Wasser	Kurz spülen

Tabelle 3.15: Entparaffinieren von in Paraffin eingebetteten Geweben

Die Küvetten I und II (*) des Xylols und Isopropanols unterscheiden sich nicht in ihrem Inhalt, sondern werden lediglich auf zwei Küvetten verteilt um Verunreinigungen zu minimieren. Es folgte anschließend die Hämatoxylin/Eosin-Färbung anhand des folgenden Protokolls (Tabelle 3.16, Reagenzien siehe Tabelle 3.1).

Behandlung/Küvette	Dauer
Hämalaun	3 min
VE-Wasser	Spülen
0,1% Eosin	10-30 sek
Fließendes Leitungswasser	Bis das durchlaufende Leitungswasser klar ist
Isopropanol 70%	Kurz eintauchen
Isopropanol 96%	Kurz eintauchen
Isopropanol 100% II*	Kurz eintauchen
Isopropanol 100% I*	Kurz eintauchen
Xylol II*	3 min
Xylol I*	3 min

Tabelle 3.16: Hämatoxylin/Eosin-Färbung von in Paraffin eingebetteten Geweben

Die gefärbten Gewebeschnitte wurden abschließend unter Verwendung von Entellan (Tabelle 3.1) eingedeckelt.

3.2.8.3 Immunhistochemische Färbungen

Antigenspezifische Färbungen ermöglichen die Bestimmung einzelner Zellpopulationen in Geweben. Dafür wurden 2 µm dicke Organschnitte auf Objektträger aufgezogen und entparaffinisiert. Dies erfolgte durch eine Wärmebehandlung bei 80°C für 30 min im Brutschrank und anschließender Entparaffinisierung wie in Tabelle 3.15 ausgeführt. Die Schnitte

wurden in mit Citratpuffer (Tabelle 3.2) befüllte Färbeküvetten überführt, für 32 min bei 300 W in der Mikrowelle erhitzt, im Citratpuffer auf RT abgekühlt und dreimalig mit VE-Wasser gewaschen. Durch diese Schritte kommt es zur Freilegung der Epitope für die anschließende Antikörperfärbung.

Die Objektträger wurden für die Färbung in spezielle Objektträgergestelle (Tabelle 3.8) eingespannt und zweimal mit Waschpuffer (Tabelle 3.2) gewaschen. Endogene Peroxidasen wurden durch Aufbringung von 100 µl Peroxidase-Block (Tabelle 3.1) für 5 min bei RT blockiert. Dadurch wird ein unspezifischer Farbumschlag des DAB durch endogene Peroxidasen minimiert, welcher durch die an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase vermittelt wird. Anschließend wurde die vorab optimierte Konzentration des Primärantikörpers in Antikörper-Diluent (Tabelle 3.1) verdünnt, je 100 µl/Objektträger aufgebracht und für 45 min bei RT inkubiert. Die Objektträger wurden danach zweimal mit Waschpuffer gewaschen und pro Objektträger je 3 Tropfen des Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpers (fertige Gebrauchslösung, Tabelle 3.6) auf die Schnitte getropft und für 45 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Schnitte zweimal mit Waschpuffer gewaschen und mit je 100 µl des DAB-Enzymsubstrats (Gebrauchslösung, siehe Tabelle 3.2) für 10 min bei RT inkubiert. Bei Umsetzung des farblosen Substrats durch die Peroxidase des Sekundärantikörpers kommt es zur spezifischen Braunfärbung der mit dem Primärantikörper markierten Zellen im Gewebe. Die Gewebeschnitte wurden eine Minute unter laufendem VE-Wasser gespült, anhand des in Tabelle 3.16 beschriebenen Protokolls mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt und mit Entellan (Tabelle 3.1) eingedeckelt.

Für jedes Antigen wurden eine Positivkontrolle (Präparat mit bekanntem Vorkommen des jeweiligen Antigens) und eine Negativkontrolle (ohne Aufbringen des Primärantikörpers) angefertigt, um unspezifische Färbungen ausschließen zu können.

3.2.8.4 Histopathologie

Die verblindete histopathologische Beurteilung der Organpräparate wurde freundlicherweise von Frau Dr. Elisabeth Huber, Pathologisches Institut der Universitätsklinik Regensburg, übernommen und erfolgte anhand bewährter histologischer GVHD-Bewertungen für den Darm (221), die Leber (221) sowie der Haut (222).

Bei der Bewertung des Darms wurden zwei Kriterien berücksichtigt: das Ausmaß der Apoptosen der Krypten sowie die Inflammation (Infiltration von Lymphozyten, Neutrophilen und Eosinophilen). Zusätzlich wurden im Dünndarm die Anzahl der Paneth-Zellen/HPF bestimmt.

	Kryptenapoptosen	Inflammation
0	Keine-selten	Keine

1	Vereinzelte apoptotische Körper /10 Krypten	Mild
2	Einige apoptotische Körper /10 Krypten	Moderat
3	Mehrheit der Krypten enthalten apoptotische Körper /10 Krypten	Schwer ohne Ulzerationen
4	Mehrheit der Krypten enthalten >1 apoptotische Körper /10 Krypten	Schwer mit Ulzerationen

Tabelle 3.17: Histopathologisches Darm-GVHD-Bewertungsschema nach Kaplan et al. (221)

Die Leber wurde anhand ihrer Schäden im Gallengang und der allgemeinen Inflammation (Infiltration von Lymphozyten, Neutrophilen und Eosinophilen) bewertet. Die Gallengangsschäden manifestierten sich unter anderem durch nukleäre Hyperchromasie, infiltrierende Lymphozyten und zytoplasmatische Vakuolisierung.

	Gallengangsschäden	Inflammation
0	Keine-selten	Keine
1	Vereinzelte Gallengänge mit mildem Schweregrad betroffen	Mild
2	Einige Gallengänge mit mildem Schweregrad betroffen	Moderat
3	Mehrheit der Gallengänge betroffen	Schwer ohne Ulzerationen
4	Die meisten Gallengänge mit hohem Schweregradbetroffen	Schwer mit Ulzerationen

Tabelle 3.18: Histopathologisches Leber-GVHD-Bewertungsschema nach Kaplan et al. (221)

Die einzelnen Kriterien für Darm und Leber erreichen je maximal einen Schweregrad von 4, der maximale histopathologische Score beträgt demnach 8. Die Haut wurde anhand eines gemischten Scores für Infiltrate und struktureller Schäden bewertet und konnte so maximal einen histopathologischen Score von 3 erreichen.

	Bewertung
0	Normal
1	Zellschwellung der basalen Keratinozyten
2	Infiltrate der Talgdrüsen
3	Verlust der Epidermis

Tabelle 3.19: Histopathologisches Haut-GVHD-Bewertungsschema nach Grass et al. (222)

3.2.9 Molekularbiologische Methoden

3.2.9.1 Isolation von RNA aus Gewebe

Gewebe, die für eine Isolation von RNA vorgesehen waren, wurden sofort nach der Sektion in RNAlater (Tabelle 3.1) gelagert. Zur Lyse wurde bis zu 30 mg Gewebe in 600 µl RLT-Puffer/2-ME (Tabelle 3.2) aufgenommen und im GentleMACS-System (2-3x Programm RNA_1.1) homogenisiert. Das Lysat wurde in einem maximalen Volumen von 350 µl über eine Säule (Quiashredder, siehe Tabelle 3.8) aufgereinigt (5 min, 9520 x g) und durch Zugabe von 350 µl 70% Ethanol gefällt. Die Isolation der RNA erfolgte durch das RNeasy Mini Kit (Tabelle

3.1) anhand des Hersteller-Protokolls. In Kürze: 700 µl Gesamtvolumen wurden auf eine Säule übertragen und 10 s bei 1166 x g, danach 15 s bei 9520 x g abzentrifugiert. Die Säule wurde auf ein neues Röhrchen überführt. Es wurden 350 µl des im Kit enthaltenen Puffers RW1 hinzugegeben und für 15 s bei 9520 x g zentrifugiert. Die Säule wurde auf ein neues Röhrchen überführt, 80 µl des im Kit enthaltenen DNase Mix dazu pipettiert und für 25 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 350 µl des RW1 Puffers auf die Säule gegeben und für 15 s bei 9520 x g abzentrifugiert. Die Säule wurde auf ein neues Röhrchen überführt und zweimal mit je 500 µl des im Kit enthaltenen RPE-Puffers abzentrifugiert (15 s bzw. 2 min, 9520 x g). Die Säule wurde einmal trocken zentrifugiert (1 min, 9520 x g). Schließlich wurde die RNA eluiert, indem die Säule auf ein 1,5 ml Röhrchen überführt, mit 40 µl RNase freiem Wasser (im Kit enthalten) für 5 min bei RT inkubiert und 1 min bei 9520 x g abzentrifugiert wurde. Die Menge der isolierten RNA wurde photometrisch bestimmt (Nanodrop, siehe Tabelle 3.9) und die Güte und Integrität der RNA auf einem RNA-Gel überprüft.

3.2.9.2 RNA-Gel

Um die Integrität der isolierten RNA zu überprüfen, wurden RNA-Gelelektrophoresen durchgeführt (Gelzusammensetzung und Ablauf siehe Tabelle 3.2; Geräte siehe Tabelle 3.9). Es wurde etwa ein Liter 1x MOPS-Puffer (Tabelle 3.2) ins Elektrophoresegerät eingefüllt, bis die Geltaschen komplett bedeckt waren. Die RNA wurde bei 37°C für 30 min inkubiert und 4 µl des Probenpuffers (Tabelle 3.2) pro µl RNA-Lösung hinzugegeben. Die Röhrchen wurden kurz zentrifugiert und für 20 min bei 65°C im Heizblock (Tabelle 3.9) inkubiert. Die RNA-Proben wurden vorsichtig in die Taschen des Gels pipettiert und für 1 h bei 67 V und 45 min bei 76 V laufen gelassen. Das fertige RNA-Gel wurde schließlich fotografiert (Typhoon, Tabelle 3.9), die Güte und Integrität der RNA anhand der jeweiligen Banden bewertet und die Fotografie zu Dokumentationszwecken abgelegt.

3.2.9.3 cDNA-Synthese durch reverse Transkription

Die reverse Transkriptase nutzt die RNA als Matrize zur Herstellung einer komplementären, einzelsträngigen DNA (cDNA). Hier wurde der M-MLV Reverse Transkriptase Kit (Tabelle 3.1) nach Herstellerangaben verwendet. In Kürze wurde 1 µg RNA in einem sterilen und RNase-freien Eppendorf-Gefäß mit 2 µl Mastermix I (Random Hexamer + 10 µM dNTPS, im Kit enthalten) vermischt, kurz zentrifugiert und die RNA für 5 min bei 65°C im Heizblock linearisiert. Danach wurden die Proben für 1 min auf Eis gestellt und kurz zentrifugiert. Die Proben wurden mit 4,5 µl des Mastermix II (5x Puffer + RNasin, im Kit enthalten) vermischt, zentrifugiert und 2 min bei 25°C inkubiert. Dies führt zur Anlagerung der Primer-Hexamere. Anschließend wurde 1 µl der M-MLV reversen Transkriptase hinzugegeben und die Proben für 10 min bei RT inkubiert. Dieser Schritt unterstützt die Verlängerung der Primer-Hexamere. Die Synthese der cDNA erfolgte im Thermocycler (siehe Tabelle 3.9, Programm: SUPER) für

50 min bei 42°C und 15 min bei 70°C. Bis zur weiteren Verwendung wurde die cDNA bei -20°C gelagert.

3.2.9.4 Quantitative RT-Polymerase Kettenreaktion

3.2.9.4.1 Prinzip der Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ermöglicht die selektive Vervielfältigung definierter DNA-Sequenzen aus einem gemischten DNA-Produkt. Dafür werden thermostabile DNA-Polymerasen eingesetzt, mit deren Hilfe die PCR automatisiert in programmierbaren Thermoblöcken durchgeführt werden kann. Der Ablauf beinhaltet das Aufschmelzen der DNA-Matrize durch Hitzedenaturierung (Denaturation), wodurch die Bindung der Primer an ihre spezifische Zielsequenz ermöglicht wird (Annealing). Ausgehend von dem dadurch entstandenen, spezifischen doppelsträngigen Bereich wird im nächsten Schritt der komplementäre Einzelstrang in 5'-3'-Richtung synthetisiert (Elongation). Diese Schritte werden mehrfach wiederholt, wodurch eine selektive Vervielfältigung und damit Anreicherung des gewünschten Transkripts entsteht. Aufgrund der hohen Sensitivität der PCR muss sehr genau und sauber gearbeitet werden, um Kontaminationen zu vermeiden. Die RT-PCR erlaubt eine quantitative Echtzeitanalyse des PCR-Produktes durch die Messung laserinduzierter Fluoreszenzsignale. Hierbei wird der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green genutzt, der in die doppelsträngige DNA interkaliert. Dadurch kann nach jedem PCR-Zyklus die Menge an doppelsträngiger DNA mit interkaliertem SYBR Green gemessen werden. Die Zyklenanzahl bei der das gemessene Fluoreszenzsignal einen vorgegebenen Schwellenwert übersteigt ergibt den Ct-Wert (*cycle threshold*, Ct).

3.2.9.4.2 Quantifizierung von RNA anhand des Protokolls der RT-PCR

Für die Quantifizierung verschiedener RNA (siehe 0) aus unterschiedlichen Organen wurde die zelluläre RNA isoliert (3.2.9.1), mit Hexamer-Primern revers in cDNA transkribiert (3.2.9.3) und in der RT-PCR quantitativ analysiert. Die Amplifikationsreaktion wurde in 96-Loch-Eppendorf-Platten mit einem Gesamtvolumen von 10 µl pro Vertiefung durchgeführt. Die benötigten Reagenzien wurden vorab in einem Mastermix gemischt und pro Vertiefung vorgelegt. Der Mastermix bestand aus je 5 µl SYBR Green (Tabelle 3.1), 0,5 µl Forward-Primer und 0,5 µl Reverse-Primer (beide 10 pmol/µl, Auswahl an Oligonukleotiden siehe Tabelle 3.11) sowie 2 µl RNase freiem Wasser. Anschließend wurden je 2 µl der jeweiligen Proben-cDNA dazu pipettiert. Für jedes Primerpaar wurde in jedem PCR-Lauf eine Standardkurve aus einer Verdünnungsreihe (1, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000) einer geeigneten Probe pipettiert, um die Effizienz der Amplifikation (*slope*) einschätzen zu können. Außerdem wurde jeweils die Amplifikation des Haushaltsgens HPRT ermittelt, um die einzelnen cDNA-Proben normalisieren zu können. Die Platte wurde vor der Analyse mit einer Folie für etwa 4 s

zugeschweißt, kurz abentrifugiert und bis zur Analyse im Kühlschrank gelagert. Die Analyse erfolgte im Gerät Thermocycler (siehe Tabelle 3.9, Programm: PCR-Programm). Das Programm bestand aus einer 5-minütigen Aktivierung der DNA-Polymerase bei 95°C, anschließend wurden 45 Zyklen durchgeführt, in der die cDNA jeweils 8 s bei 95°C denaturiert wurde und für 20 s bei 60°C das *Annealing* der Primer sowie die *Elongation* stattfand. Die Fluoreszenzmessung erfolgte nach jedem Zyklus. Nach dem Ende des Amplifikationsprogramms wurde das Schmelzverhalten der amplifizierten DNA analysiert. Dazu wurde die DNA langsam von 60°C auf 90°C erhitzt und kontinuierlich deren Fluoreszenz gemessen. Anhand der Analyse der Schmelzkurve kann die Spezifität der PCR-Reaktion überprüft werden.

3.2.10 Statistik

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM (*standard error of mean*) dargestellt. Die graphische und statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., CA USA). Überlebenskurven wurden unter Zuhilfenahme des Log-Rang-Tests analysiert. Bei parametrischen Tests wurde Normalverteilung vorausgesetzt. Die statistische Analyse erfolgte deshalb anhand des ungepaarten t-Tests (2 Werte) bzw. der ein- oder zweifaktoriellen Anova (>2 Werte) mit anschließendem Tukey post-hoc Test. Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit (p) < 0,05 wurden als signifikant erachtet (* p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001).

4 Ergebnisse

4.1 *In vitro* Expansion von CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen

Da regulatorische T-Zellen im peripheren Blut des Menschen nur ca. 1-3% der mononukleären Zellen ausmachen, ist deren klinische Anwendung zur Behandlung der aGVHD von der Isolierung einer möglichst reinen (Ausgangs-)Population sowie ihrer effektiven *in vitro* Expansion abhängig. Da diese Strategie im murinen System möglichst genau simuliert werden sollte, wurde auch hier ein *in vitro* Kultursystem angewandt.

4.1.1 Anreicherung von Treg aus Primärzellen der Milz

Um reine Ausgangspopulationen von CD4⁺ Treg und Tkonv für die *in vitro* Expansion zu generieren, wurden Milzzellen von BALB/c-Mäusen zuerst mit PE-konjugiertem CD25-Antikörper gefärbt, mit anti-PE-Microbeads markiert und mittels magnetischer Zellseparation in CD25-exprimierende und CD25-negative Zellen getrennt.

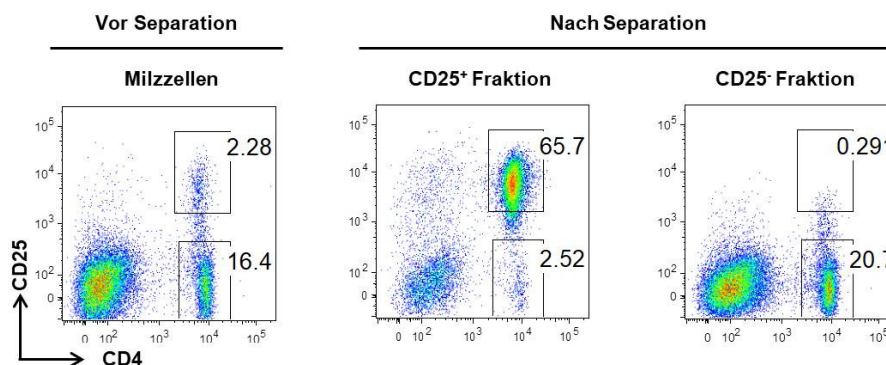


Abb. 4.1: Magnetbasierte Zellanreicherung von murinen CD25-exprimierenden Zellen aus der Milz

Maus-Milzzellen wurden in Einzelzellsuspension gebracht und mittels magnetischer Zellseparation in eine CD25-Positiv- und Negativfraktion getrennt. Von der Ausgangspopulation (Milzzellen, links) direkt vor der Aufreinigung und den jeweiligen Fraktionen nach Separation (Positivfraktion, Mitte und Negativfraktion, rechts) wurde je ein Aliquot zur durchflusszytometrischen Reanalyse entnommen. Dargestellt sind lebende Zellen im Leukozytengate nach Ausschluss von Doubletten.

In murinen Milzzellen (Abb. 4.1, links) bestand nur ein kleiner Prozentsatz (< 5 %) aus CD4⁺CD25⁺ T-Zellen. Diese konnten durch die magnetbasierte Separation effektiv angereichert (Abb. 4.1, Mitte) und so für die anschließende FACS-basierte Sortierung verwendet werden. Da bereits aus der Literatur (223) bekannt war, dass die CD62L⁺ Subpopulation unter den CD4⁺CD25⁺ Zellen nach *in vitro* Expansion zu nahezu 100% Foxp3 exprimieren und einen stabilen Treg-Phänotyp aufweisen, wurden in der Expansionskultur hauptsächlich CD62L⁺ Treg-Zellen untersucht, daneben aber auch Funktion und phänotypische Stabilität der CD62L⁻ Subpopulation adressiert. Hierzu wurde die CD25-Positivfraktion mit Fluorochrom-markierten Antikörpern gegen CD4 und CD62L gefärbt und anhand

dieser Marker hoch rein in die verschiedenen Subpopulationen von Treg ($CD4^+CD25^{high}CD62L^+$ und $CD4^+CD25^{high}CD62L^-$) sortiert. Die CD25-Negativfraktion wurde genutzt, um $CD4^+CD25^-$ konventionelle T-Zellen zu generieren (Abb. 4.2).

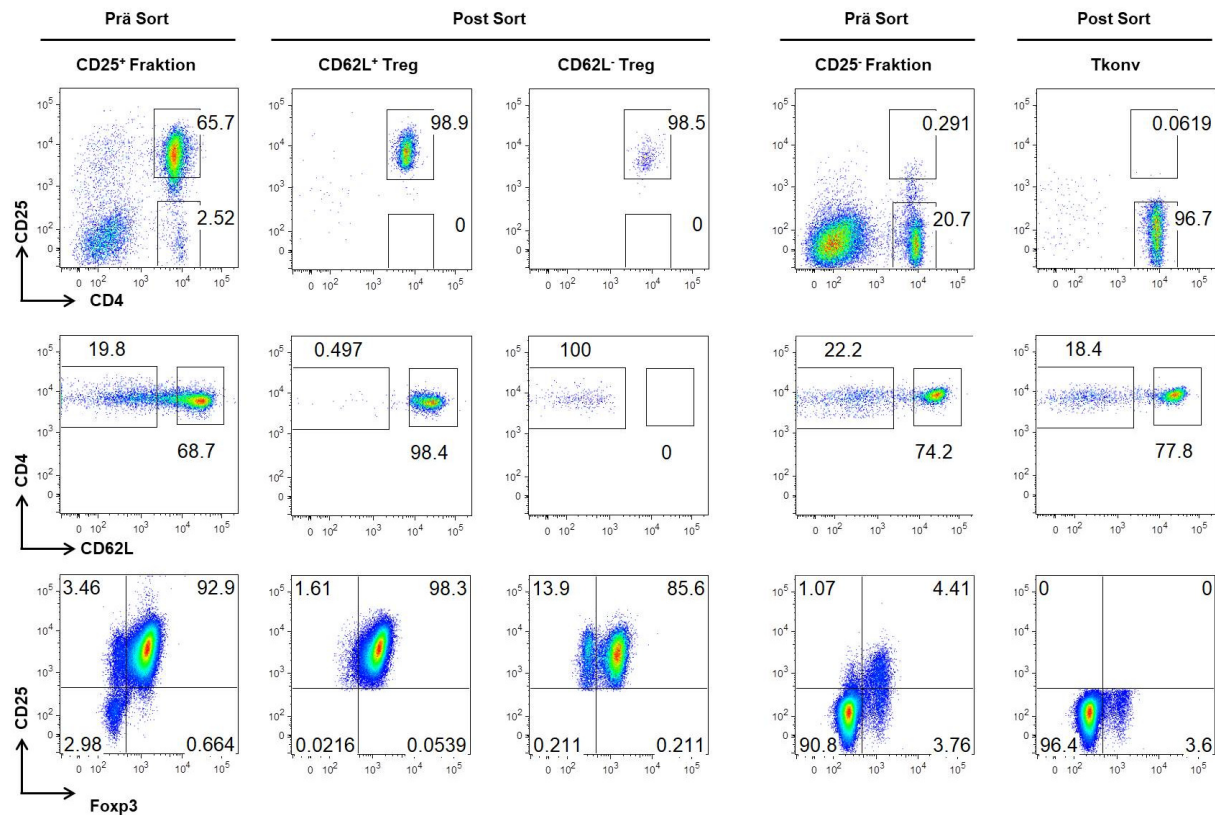


Abb. 4.2: FACS-basierte Sortierung von $CD62L^+$ und $CD62L^-$ Treg- sowie $CD4^+CD25^-$ Tkonv-Zellen
 Die mittels MACS angereicherte CD25-Positivfraktion muriner Milzzellen wurde mit anti-CD4- und anti-CD62L-Antikörpern gefärbt und am FACS Aria II in $CD4^+CD25^{high}CD62L^+$ und $CD4^+CD25^{high}CD62L^-$ Treg-Populationen sortiert. Aus der vorangereicherten CD25-Negativfraktion wurde nach Färbung mit Fluorochrom-makierten anti-CD4- und CD62L-Antikörpern $CD4^+CD25^-$ Tkonv-Zellen ohne Berücksichtigung des Markers CD62L sortiert. Eine Reanalyse hinsichtlich der Sortierparameter erfolgte am Aria II. Zusätzlich wurden Aliquots der angereicherten Ausgangspopulationen sowie der sortierten Subpopulationen auf Foxp3 gefärbt und am LSR II analysiert (unterste Reihe). Dargestellt sind repräsentative Plots lebender Zellen nach Ausschluss von Doubletten ohne (Reihe oben) oder mit Berücksichtigung von CD4 (mittlere und unterste Reihe).

Nach der FACS-Sortierung konnte regelmäßig eine Reinheit von $> 96\%$ für die einzelnen Sortierparameter erreicht werden (siehe Abb. 4.2 oben und Mitte rechts). Hinsichtlich des Treg-spezifischen Markers Foxp3 (siehe Abb. 4.2 unten rechts) zeigten die $CD62L^+$ Treg eine einheitliche Foxp3-Expression ($96,59 \pm 0,49\%$), während $CD62L^-$ Treg zu über 10% Foxp3 ($11,67 \pm 0,80\%$) waren. Interessanterweise enthielt auch die $CD25^-$ Tkonv-Population einen geringen Prozentsatz an Foxp3⁺ Zellen ($4,03 \pm 0,80\%$), diese befanden sich jedoch ausschließlich auf Grund ihrer fehlenden CD25-Expression in der Tkonv-Subpopulation.

4.1.2 Expansion und Phänotyp von CD62L⁺ und CD62L⁻ Treg-Zellen

Für die *in vitro* Expansion wurden die beiden Treg-Subpopulationen sowie die Tkonv-Zellen anschließend für 14d entsprechend des in Abschnitt 3.2.6.1 ausführlich beschriebenen und in Abb. 4.3 skizzierten Protokolls kultiviert.

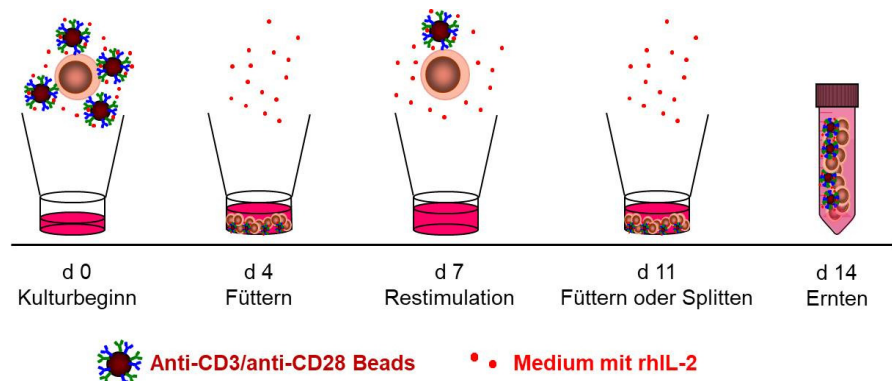


Abb. 4.3: Kulturbedingungen für die *in vitro* Expansion regulatorischer T-Zellen

CD62L⁺ und CD62L⁻ Treg-Zellen wurden für 7d in 96-Loch-Rundbodenplatten mit 4 Beads/Zelle und 2000U/ml rhu IL-2 stimuliert, danach geerntet, in 24-Loch-Platten neu ausgesät und für weitere 7d mit 1 Bead/Zelle in Gegenwart von rhu IL-2 restimuliert. Tkonv-Zellen wurden unter denselben Bedingungen kultiviert, initial jedoch nur mit 2 Beads/Zelle stimuliert und durchgehend mit 100 U/ml rhu IL-2 supplementiert. Details siehe Abschnitt 3.2.6.1. An d14 wurden die Zellen geerntet und analysiert.

Hierzu wurden die Zellen zuerst in 96-Loch-Rundbodenplatten und nach Restimulation an d7 in 24-Loch-Platten kultiviert. Die Stimulation erfolgte mittels anti-CD3/CD28-gekoppelter Magnetbeads in Gegenwart von rekombinantem humanen IL-2 (rhIL-2). Bei Bedarf erfolgte eine Supplementierung mit IL-2-haltigem Kulturmedium bzw. das Anlegen zusätzlicher Kulturen (Abb. 4.3). Die einzelnen Stimulationsansätze an d0 und d7 für Treg- und Tkonv-Zellen sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

Ansatz/Loch	Tag	Platte	Volumen	Zellen	Beads	rhIL-2
CD62L ⁺ Treg	0	96-Loch-Rundboden	100 µl	10.000	40.000	200 U
	7	24-Loch-Flachboden	1000 µl	1 x 10 ⁶	1 x 10 ⁶	2000 U
CD62L ⁻ Treg	0	96-Loch-Rundboden	100 µl	10.000	40.000	200 U
	7	24-Loch-Flachboden	1000 µl	1 x 10 ⁶	1 x 10 ⁶	2000 U
Tkonv	0	96-Loch-Rundboden	100 µl	10.000	20.000	10 U
	7	24-Loch-Flachboden	1000 µl	500.000	500.000	100 U

Tabelle 4.1: Stimulationsbedingungen in der Expansionskultur von Treg- und Tkonv-Zellen

An d14 wurden die *in vitro* expandierten Treg- und Tkonv-Populationen bezüglich ihrer Expansionsrate und durchflusszytometrisch auf die intranukleäre Expression des linien-definierenden Transkriptionsfaktors Foxp3 untersucht (siehe Abb. 4.4).

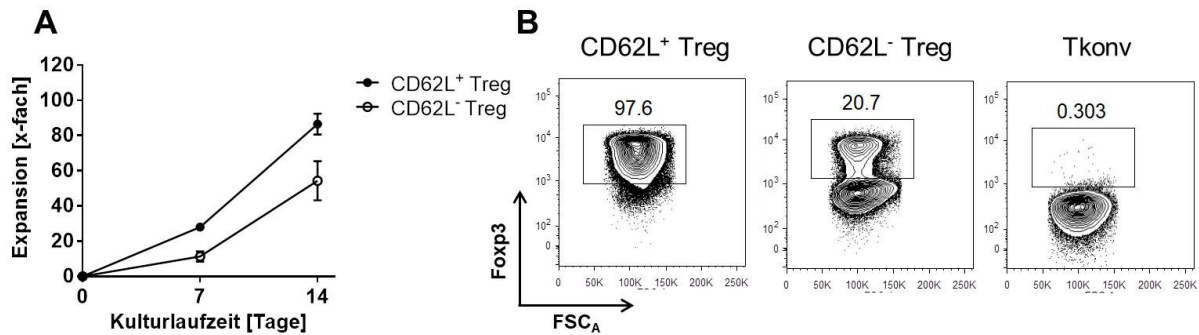


Abb. 4.4: Expansionsrate und Foxp3-Expression von CD62L⁺ und CD62L⁻ Treg-Zellen nach 14-tägiger *in vitro* Expansion

(A) CD62L⁺ (●) und CD62L⁻ (○) Treg-Zellen aus BALB/c Mäusen wurden *in vitro* kultiviert und an d7 (Restimulation) und d14 (Kulturende) geerntet und gezählt. (B) An d14 wurden beide Zellpopulationen sowie parallel kultivierte Tkonv-Zellen zusätzlich hinsichtlich ihrer Foxp3-Expression analysiert (gezeigt sind zusammengefasste Ergebnisse als MW ± SEM (A) und repräsentative Beispiele (B) von n=7 (CD62L⁻ Treg) bzw. je n=50 (CD62L⁺ Treg und Tkonv) unabhängigen Kulturen).

Die gewählten Kulturbedingungen führten zu einer stabilen Expansionsrate (Abb. 4.4. A) der CD62L⁺ Treg-Zellen, die nach 14d bei $86,6 \pm 5,9$ -fach lag, während CD62L⁻ Treg-Zellen innerhalb von 14d deutlich schwächer und mit einer höheren Varianz expandierten ($54,3 \pm 11,1$ -fach). Gleichzeitig zeigten die CD62L⁺ Treg eine stabile Foxp3-Expression, wohingegen CD62L⁻ Treg-Zellen nach 14-tägiger Expansion nur noch zu einem geringen Prozentsatz Foxp3 exprimierten (Abb. 4.4. B und Abb. 4.5 A).

Um abzuklären, ob der Rückgang der Foxp3⁺ Zellen während der Expansionskultur auf dem Überwachsen der Treg-Zellen durch die in der Ausgangspopulation vorhandenen Foxp3⁺ Tkonv-Zellen beruht oder auf einer instabilen Foxp3-Expression der CD62L⁻ Treg-Zellen, wurden verschiedene Populationen aus Foxp3^{GFP} Reportermäusen isoliert und *in vitro* expandiert (Abb. 4.5).

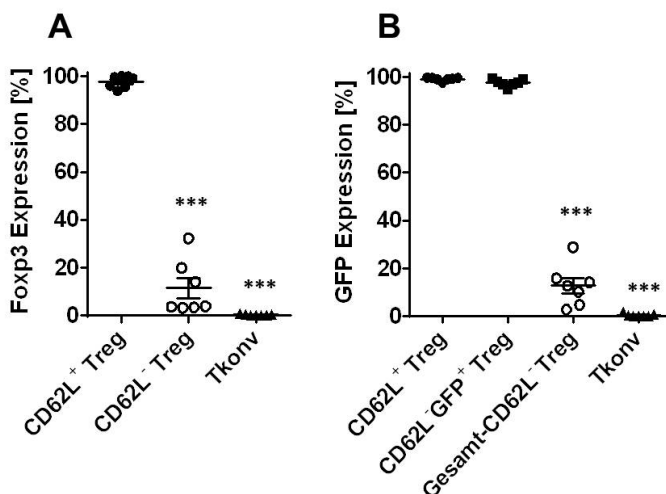


Abb. 4.5: Foxp3- bzw. GFP-Expression von BALB/c und Foxp3^{GFP} Treg und Tkonv nach *in vitro* Expansion

Die einzelnen Zellpopulationen wurden isoliert, *in vitro* expandiert wie in Abb. 4.3 beschrieben und anschließend mittels FACS analysiert. Foxp3- bzw. GFP/Foxp3-Expression der CD62L⁺ (●), CD62L⁻ (○) Treg, sowie der CD62L⁻GFP⁺ Treg (■) und Tkonv (▲) aus (A) BALB/c-Mäusen und (B) Foxp3^{GFP}-Reportermäusen (C57BL/6). Je n=7, *** p<0,001.

Wurden Gesamt-CD4⁺CD25⁺CD62L⁻ T-Zellen als Ausgangspopulation für die Expansionskultur sortiert, so enthielten diese an d0 einen ähnlichen Anteil an Foxp3⁺ Zellen ($16,60 \pm 1,45\%$

Foxp3⁺ bzw. GFP⁺) wie die aus BALB/c Mäusen isolierten Zellen (gezeigt in Abb. 4.2) und nach 14-tägiger *in vitro* Kultur exprimierten, ähnlich wie in Kulturen aus BALB/c Donoren ($11,52 \pm 4,26\%$, Abb. 4.5 A) nur noch ein geringer Prozentsatz an Zellen Foxp3 ($12,73 \pm 3,24\%$, Abb. 4.5 B). Wurden dagegen als Ausgangspopulation CD4⁺CD25⁺CD62L⁻GFP⁺ T-Zellen gewählt, so zeigten diese nach 14-tägiger *in vitro* Kultur eine ähnlich stabile Foxp3-Expression ($97,53 \pm 0,55\%$, Abb. 4.5 B) wie die parallel aus denselben Tieren isolierten CD62L⁺ Treg ($99,01 \pm 0,27\%$, Abb. 4.5 B). Damit wird deutlich, dass der Verlust der Foxp3-Expression in der Expansionskultur von CD62L⁻ Treg vor allem auf das Überwachsen der Kultur durch kontaminierende Foxp3⁺ Tkonv-Zellen zurückzuführen war.

4.1.3 Funktionelle Charakterisierung *in vitro* expandierter CD62L⁺ Treg-Zellen

4.1.3.1 Immunsuppressive Aktivität nach *in vitro* Kultur

Da CD62L⁺ Treg-Zellen sowohl bei ihrer Isolierung als auch nach 14-tägiger *in vitro* Kultur eine homogene und stabile Foxp3-Expression zeigten, wurde diese Treg-Subpopulation weiter untersucht und in den Experimenten eingesetzt.

Zur vergleichenden Untersuchung der suppressiven Aktivität frisch isolierter und *in vitro* expandierter Treg-Zellen wurde ein *in vitro* Suppressionsassay durchgeführt. Hierzu wurden syngene CD4⁺CD25⁻ Tresp-Zellen frisch isoliert und mit CFSE markiert. Die polyklonale Stimulation erfolgte mittels syngener APC (CD90.2-depletierte, bestrahlte Milzzellen) und 0,4 µg/ml anti-CD3-Antikörper. Frisch isolierte oder *in vitro* expandierte CD62L⁺ Treg-Zellen wurden in verschiedenen Mengen hinzugegeben. Als Kontrolle dienten *in vitro* expandierte Tkonv-Zellen. Die Proliferation der Tresp-Zellen wurde nach 3-4 Tagen anhand der CFSE-Verdünnung durchflusszytometrisch bestimmt (Abb. 4.6).

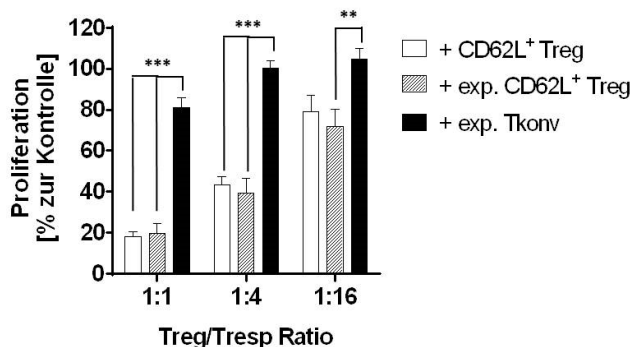


Abb. 4.6: Suppressiva Kapazität der *in vitro* expandierten im Vergleich zu frisch isolierten CD62L⁺ Treg

Nach *in vitro* Expansion von CD62L⁺ Treg (exp. CD62L⁺ Treg) wurde deren suppressive Aktivität im Vergleich zu frisch isolierten CD62L⁺ Treg (CD62L⁺ Treg) und expandierten Tkonv (exp. Tkonv) durch einen *in vitro* Suppressionsassay bestimmt ($n=5-8$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$). Kumulative Daten aus der vorliegenden Arbeit und Vorarbeiten von Tina Böld (AG Edinger, UKR).

Während Tkonv-Zellen nur bei einem 1:1 Verhältnis eine leichte suppressive Wirkung von etwa 19% auf die Proliferation der Tresp zeigten (vermutlich aufgrund ihrer Konkurrenz um Kostimulation), wurde diese durch *in vitro* expandierte und frisch isolierte CD62L⁺ Treg-Zellen dosisabhängig gleich stark supprimiert. Bei einer Treg:Tresp Ratio von 1:1 war die Proliferation der Tresp-Zellen in Kokultur mit frisch isolierten CD62L⁺ Treg-Zellen zu über 80% supprimiert und verringerte sich auf $18,09 \pm 2,25\%$ der Proliferation reiner Tresp-Zellen. Wurden die Tresp-

Zellen im Verhältnis 1:1 mit *in vitro* expandierten CD62L⁺ Treg-Zellen kultiviert, so war ebenfalls eine Suppression der Tresp-Zellen von über 80% zu beobachten, die Proliferation der Tresp-Zellen sank auf $19,54 \pm 4,97\%$ der Kontrolle. Mit abnehmender Treg:Tresp Ratio verringerte sich der suppressive Effekt von frisch isolierten Treg auf etwa 21% ($79,13 \pm 8,07\%$ Proliferation der Kontrolle bei einer 1:16 Ratio) und auf etwa 29% ($71,76 \pm 8,57\%$ bei einer 1:16 Ratio) bei Einsatz von *in vitro* expandierten CD62L⁺ Treg.

4.1.3.2 Zytokinprofil nach in vitro Kultur

Regulatorische T-Zellen produzieren keine pro-inflammatorischen Zytokine, weshalb die fehlende Produktion und Sekretion solcher Zytokine nach Stimulation als indirektes Indiz für die Identität und Reinheit des *in vitro* generierten Treg-Produkts herangezogen werden kann.

Zur Erstellung eines Zytokinprofils wurden *in vitro* expandierte CD62L⁺ Treg-Zellen sowie Tkonv-Zellen für 4-5h mit den TCR-unabhängigen Stimulantien PMA und Ionomycin inkubiert. Die Sekretion der Zytokine wurde durch die Zugabe von Monensin (Golgi-Stop) verhindert und diese anschließend intrazellulär mittels FACS nachgewiesen. Zum Vergleich wurden frisch isolierte CD62L⁺ und CD62L⁻ Treg- und Tkonv-Zellen analysiert. Hierzu wurden CD4⁺CD62L⁺ und CD4⁺CD62L⁻ T-Zellen durchflusszytometrisch sortiert und nach *in vitro* Stimulation mit PMA und Ionomycin nicht nur hinsichtlich ihrer Zytokinproduktion analysiert, sondern auch mit Fluorochrom-markierten Antikörpern gegen Foxp3 gefärbt, was eine Unterscheidung von Treg- und Tkonv-Subpopulationen innerhalb der jeweiligen CD62L-Subpopulationen ermöglichte (Abb. 4.7). Dieser Ansatz wurde gewählt, da T-Zellen nach Stimulation mit PMA/Ionomycin CD62L herunter regulieren und dieser Marker deshalb durchflusszytometrisch nicht mehr nachweisbar ist.

In frisch isolierten, naiven (CD62L⁺) Treg konnten selbst nach Stimulation mit PMA/Ionomycin keine nennenswerten Mengen an IL-6, IL-17A, IL-2, IFN- γ oder IL-10 nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu fanden sich unter den frisch isolierten Antigen-erfahrenen (CD62L⁻) Treg $4,73 \pm 0,49\%$ IL-2-Produzenten und $15,37 \pm 1,01\%$ IFN- γ -Produzenten, während $6,98 \pm 0,16\%$ der Zellen IL-10 produzierten.

Ein ähnliches Bild ergab sich für frisch isolierte Tkonv-Zellen. Hier fanden sich unter den CD62L⁺ naiven Zellen lediglich $18,67 \pm 3,26\%$ IL-2-Produzenten, während in der CD62L⁻ Subpopulation $67,43 \pm 0,58\%$ der Zellen IL-2, $57,83 \pm 5,58\%$ der Zellen IFN- γ und $5,75 \pm 0,26\%$ der Zellen IL-10 produzierten.

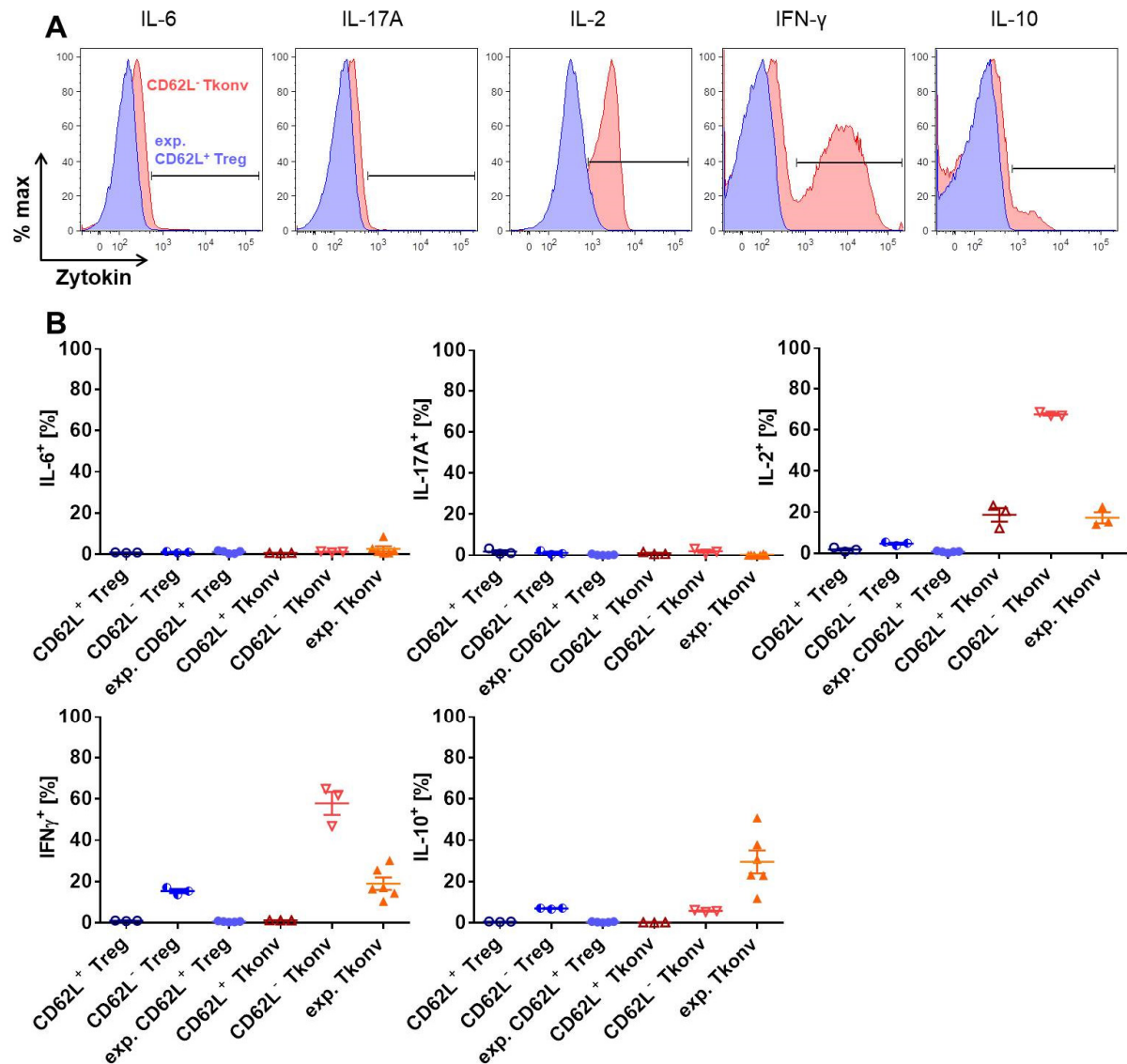


Abb. 4.7: Zytokinprofil frisch isolierter und *in vitro* expandierter Treg- und Tkonv-Zellen

Frisch isolierte und *in vitro* expandierte (exp.) Treg und Tkonv-Populationen wurden mit PMA/Ionomycin in Gegenwart von Monensin für 4-5 h bei 37°C stimuliert. Die Analyse der Zytokinsekretion erfolgte durchflusszytometrisch nach intrazellulärer Färbung. (A) Overlays der Histogramme für die Zytokine IL-6, IL-17A, IL-2, IFN-γ und IL-10 von expandierten CD62L⁺ Treg (blau) und frisch isolierten CD62L⁻ Tkonv (rot) als Referenz. (B) MW ± SEM der prozentualen Zytokinproduzenten unter frisch isolierten CD62L⁺ (○), und CD62L⁻ Treg (●), *in vitro* expandierten CD62L⁺ Treg (exp. Treg, ●) sowie frisch isolierten CD62L⁺ (Δ) und CD62L⁻ Tkonv (Δ) und *in vitro* expandierten Tkonv (exp. Tkonv, ▲) aus je n=3-6 unabhängigen Kulturen.

Nach 14-tägiger Expansionskultur sekretierten CD62L⁺ Treg selbst nach TCR-unspezifischer Stimulation mit PMA/Ionomycin keines der untersuchten Zytokine, während *in vitro* expandierte Tkonv weiterhin IL-2 ($17,27 \pm 2,69\%$), IFN-γ ($18,97 \pm 3,01\%$) und nach der Expansion deutlich stärker IL-10 ($29,52 \pm 5,54\%$) produzierten.

4.1.4 Phänotypische Charakterisierung *in vitro* expandierter CD62L⁺ Treg-Zellen

Da CD62L⁺ Treg auch nach der *in vitro* Expansion einen stabilen Phänotyp zeigten, wurden sie im Folgenden ausführlich bezüglich ihres Entwicklungs- und Aktivierungsstatus, ihres Treg-

Phänotyps sowie der Expression von Rezeptoren für die Migration in den GI-Trakt charakterisiert (Abb. 4.8).

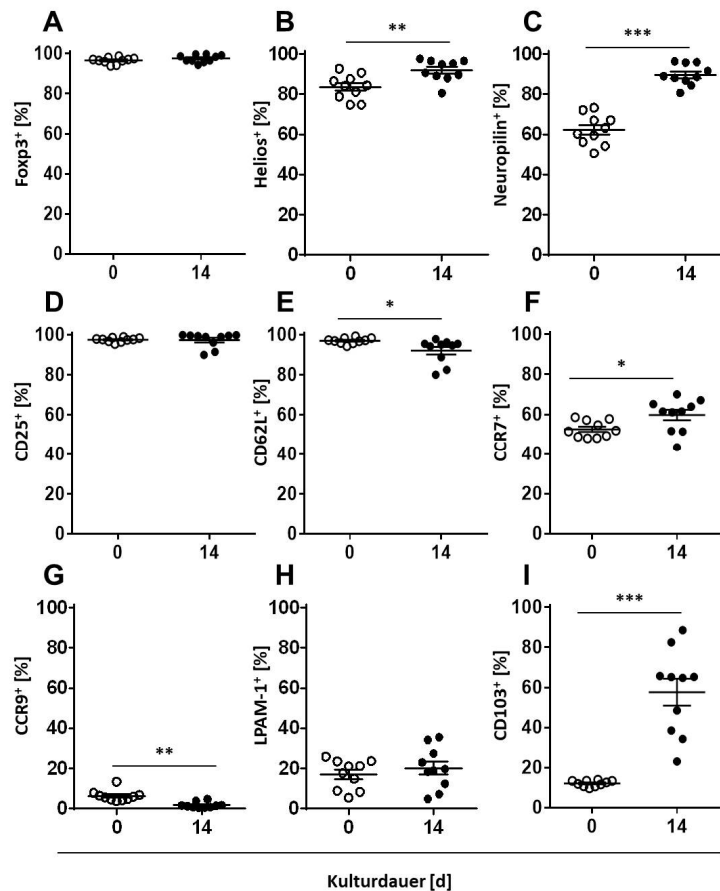


Abb. 4.8: Phänotypische Charakterisierung *in vitro* expandierter CD62L⁺ Treg

CD62L⁺ Treg aus BALB/c Donoren wurden zu Beginn sowie nach 14-tägiger *in vitro* Kultur mit Fluorochrom-markierten Antikörpern gegen die Treg-assoziierten Marker Foxp3 (A), Helios (B) und Neuropilin (C), die Aktivierungs- und Differenzierungsmarker CD25 (D), CD62L (E) und CCR7 (F) sowie die Migrationsmarker CCR9 (G), LPAM-1 (H) und CD103 (I) gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert (n=10 unabhängige Kulturen, * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001).

Wie bereits in Abb. 4.4 gezeigt, behielten CD62L⁺ Treg ihren Foxp3⁺-Phänotyp ($96,6 \pm 0,5\%$ an d0) auch nach *in vitro* Expansion bei ($97,6 \pm 0,6\%$, Abb. 4.8 A). Darüber hinaus exprimierten $83,5 \pm 2,0\%$ (Abb. 4.8 B) der frisch isolierten CD62L⁺ Treg den tTreg-assoziierten Transkriptionsfaktor Helios und $62,3 \pm 2,4\%$ exprimierten zusätzlich Neuropilin (Abb. 4.8 C), das ebenfalls als präferentiell auf tTreg exprimierter Marker diskutiert wird. Die nach der 14-tägigen Kulturperiode signifikant gesteigerte Expression beider Marker (Helios: $91,9 \pm 1,7\%$ und Neuropilin: $89,7 \pm 1,7\%$) bestätigte wiederum den stabilen tTreg-Phänotyp von CD62L⁺ Treg nach *in vitro* Kultur.

Erwartungsgemäß exprimierten alle Zellen auch nach *in vitro* Kultur CD25, wobei die Expressionsstärke gegenüber frisch isolierten Treg noch deutlich zunahm (Abb. 4.8 D und nicht gezeigte Daten). Interessanterweise veränderte sich die Expression von CD62L (Abb. 4.8 E) und CCR7 (Abb. 4.8 F) nur geringfügig. Dieses Phänomen zeigte sich auch bei der *in*

in vitro Expansion humaner CD45RA⁺ Treg (214) und steht im deutlichen Gegensatz zum Verhalten *in vitro* kultivierter Tkonv, die beide Marker nach TCR-vermittelter Stimulation signifikant herunterregulierten (Daten nicht gezeigt).

In vivo wird nach Antigenkontakt im Lymphknoten das Migrationspotential aktivierter T-Zellen geprägt indem die Expression verschiedener, teils organspezifischer Migrationsrezeptoren induziert wird. Um zu untersuchen, ob die *in vitro* Stimulation mittels CD3/CD28-gekoppelter Magnetbeads (trotz stabiler CD62L- und CCR7-Expression) zur Hochregulation einzelner Migrationsrezeptoren führt, wurde die Expression vor allem der darmspezifischen Moleküle CCR9, LPAM-1 und CD103 genauer betrachtet. Wie in Abb. 4.8 G gezeigt, exprimierten nur $6,3 \pm 0,9\%$ der Zellen in der Ausgangspopulation CCR9 und dieser Prozentsatz nahm im Verlauf der Kultur noch weiter auf $1,7 \pm 0,5\%$ ab. LPAM-1 (auch $\alpha_4\beta_7$ -Integrin) wurde zu Beginn der Kultur bereits von $17,0 \pm 2,3\%$ der Zellen exprimiert (Abb. 4.8 H) und dieses Expressionslevel blieb auch nach der *in vitro* Expansion erhalten ($20,1 \pm 4,0\%$). Das $\alpha_4\beta_7$ -Integrin CD103 wurde nach *in vitro* Kultur im Vergleich zur Ausgangspopulation ($12,2 \pm 0,5\%$) signifikant hoch reguliert, sodass im finalen Treg-Produkt $57,7 \pm 6,7\%$ der Zellen CD103 exprimierten (Abb. 4.8 I).

Zuletzt wurde mittels Färbung mit anti-Ki-67-Antikörpern der Anteil proliferierender Zellen vor und nach *in vitro* Kultivierung bestimmt um Aufschlüsse bezüglich des Aktivierungszustands und Expansionsvermögens therapeutisch applizierter Treg-Zellen zu erhalten (Abb. 4.9).

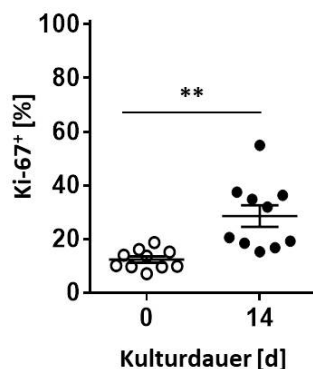


Abb. 4.9: Proliferation *in vitro* expandierter CD62L⁺ Treg
 CD62L⁺ Treg aus BALB/c Donoren wurden bzw. nach 14-tägiger *in vitro* Kultur intrazellulär mit Fluorochrom-markierten Antikörpern gegen den Proliferationsmarker Ki-67 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert (n=10 unabhängige Kulturen, ** p<0,01).

Die Ausgangspopulation an naiven CD62L⁺ Treg enthielt einen Anteil von $12,4 \pm 1,2\%$ proliferierender Zellen, der nach 14-tägiger *in vitro* Expansionskultur auf $28,6 \pm 4,0\%$ signifikant anstieg. Damit befand sich ein relevanter Anteil der *in vitro* kultivierten Zellen zum Zeitpunkt der therapeutischen Applikation in einem aktiv proliferierenden Zustand.

Zusammengefasst konnten murine Treg unter den gewählten Kulturbedingungen innerhalb von 14d etwa 85-fach expandiert werden. Dabei zeigte sich, dass lediglich die Sortierung von CD62L⁺ Treg-Zellen eine hinreichend reine und stabile Ausgangspopulation für die *in vitro* Expansion lieferte. Die suppressive Aktivität der Zellen (Abb. 4.6), ihr Zytokinprofil (Abb. 4.7)

sowie die Expression weiterer Treg-assoziiierter Marker wie Neuropilin und Helios (Abb. 4.8 B und C) blieben ebenso erhalten wie die Expression des liniendefinierenden Transkriptionsfaktors Foxp3 (Abb. 4.5 A). Die Expression darmspezifischer Migrationsrezeptoren (Abb. 4.8 H, I) wies darauf hin, dass diese Treg-Zellpopulation zumindest das Potential hat in den Gastrointestinaltrakt zu migrieren, was für die Behandlung einer aGVHD von Bedeutung sein könnte.

4.2 Isolation von Leukozyten aus gastrointestinalem Gewebe

4.2.1 Etablierung der Methode

Der GI-Trakt ist eines der Hauptzielorgane in der aGVHD und die Darmbeteiligung entscheidend für den Krankheitsverlauf und die Mortalität dieser Transplantationskomplikation. Deshalb ist insbesondere die Therapie der Darm-GVHD für die Verbesserung der Transplantationsergebnisse von entscheidender Bedeutung. Um die Kinetik der aGVHD im haploidenten KMT-Modell sowie den Einfluss der in den nachfolgenden Experimenten durchgeführten Therapie mit *in vitro* expandierten regulatorischen T-Zellen auf den GI-Trakt einordnen zu können, wurde zuerst die Isolation von Leukozyten aus verschiedenen Bereichen des Darmgewebes etabliert. Die Isolation von Leukozyten aus gastrointestinalem Gewebe wurde anhand des Colons etabliert und erfolgte nach dem in Abb. 4.10 dargestellten Grundprinzip, das durch systematische Variation verschiedener Parameter (Tabelle 3.2) optimiert wurde.

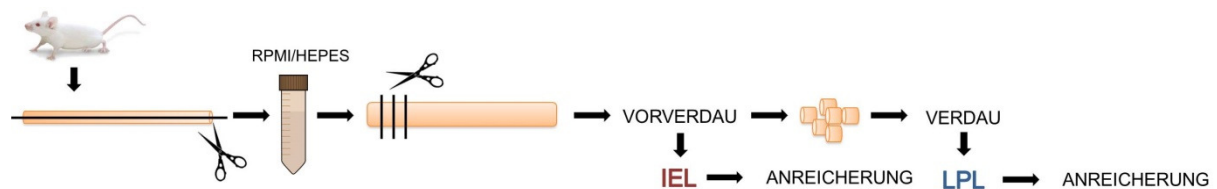


Abb. 4.10: Schema der Isolation von Leukozyten aus gastrointestinalem Gewebe

Im Einzelnen wurde das Colon aseptisch entnommen, aufgeschnitten und gespült. Das Gewebe wurde anschließend in 1-3 cm lange Stücke geschnitten und zusammen mit HBSS/EDTA und 1mM DTT bei 37°C „vorverdaut“. In diesem Schritt wurde der Epithelzellverband gelockert und der Mucus entfernt, sodass die intraepithelialen Leukozyten (IEL) herausgelöst werden konnten. Anschließend erfolgte der enzymatische Verdau bei 37°C mit 25 µg/ml LiberaseTM (L) und unterschiedlichen Konzentrationen DNase I (D). Dadurch wurden Lamina propria Leukozyten (LPL) aus dem Gewebe gelöst. Anschließend wurden die Leukozyten in den so isolierten Zellen entweder mittels eines Percoll-Gradienten (P, unterschiedliche Gradienten) oder mit Hilfe von CD45-Beads und einer AutoMACS-basierten Separation (AM) angereichert. Einige der Variationen und deren Effektivität in der Herauslösung einer reinen, möglichst vitalen cLPL-Population sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst.

Donor	Vorverdau – Ablauf	Verdau – Ablauf	Verdau - Zusätze	Anreicherun g	Zellzahl (MW)	Verunreinigun g mit IEL
BALB/c	30 min im 50 ml Falcon im Rotator	30 min mit Rührfisch im Becherglas	25 µg/ml L 0,3 mg/ml D	P (40%/80%)	0 (n=6)	ja
C57BL/6	30 min im 50 ml Falcon im Rotator	30 min im 50 ml Falcon im Rotator	25 µg/ml L 0,3 mg/ml D	P (40%/80%)	$1,0 \times 10^6$ (n=2)	ja
C57BL/6	3x 15 min im 50 ml Falcon im Rotator	40 min im 50 ml Falcon im Rotator	25 µg/ml L 0,3 mg/ml D	P (40%/80%)	$0,2 \times 10^6$ (n=2)	nein
C57BL/6	3x 15 min im 15 ml Falcon im Rotator	40 min im 15 ml Falcon im Rotator	25 µg/ml L 0,3 mg/ml D	P (40%/80%)	$0,6 \times 10^6$ (n=2)	nein
C57BL/6	3x 15 min im 15 ml Falcon im Rotator	60 min im 15 ml Falcon im Rotator	25 µg/ml L 0,3 mg/ml D	P (40%/80%)	$0,2 \times 10^6$ (n=2)	nein
BALB/c	3x 15 min im 15 ml Falcon im Rotator	45 min im 15 ml Falcon im Rotator	25 µg/ml L 0,3 mg/ml D	P (40%/70%)	$2,4 \times 10^6$ (n=2)	nein
BALB/c	3x 15 min im 15 ml Falcon im Rotator	45 min im 15 ml Falcon im Rotator	25 µg/ml L 0,3 mg/ml D	P (30%) + P (40%/70%)	$2,7 \times 10^6$ (n=3)	nein
BALB/c	3x 15 min im 15 ml Falcon im Rotator	45 min im 15 ml Falcon im Rotator	25 µg/ml L 0,3 mg/ml D	P (30%) + P (40%/70%)	$2,3 \times 10^6$ (n=4)	nein
GVHD- Tiere	3x 15 min im 15 ml Falcon im Rotator	45 min im 15 ml Falcon im Rotator	25 µg/ml L 0,5 mg/ml D	P (45%/75%)	$5,0 \times 10^6$ (n=4)	nein
BALB/c	3x 15 min im 15 ml Falcon im Rotator EDTA vor Verdau auswaschen	45 min im 15 ml Falcon im Rotator	25 µg/ml L 0,5 mg/ml D	anti-CD45- Beads AM	$1,3 \times 10^6$ (n=3)	nein
BALB/c	3x 15 min im 15 ml Falcon im Rotator EDTA vor Verdau auswaschen	45 min im 15 ml Falcon im Rotator	25 µg/ml L 0,5 mg/ml D	Vgl. (P) (45%/75%) vs. anti-CD45- Beads AM	P: $1,4 \times 10^6$ AM: $2,0 \times 10^6$ (je n=4)	nein
BALB/c	3x 15 min im 15 ml Falcon im Rotator EDTA vor Verdau auswaschen	30 min im 15 ml Falcon im Rotator + GentleMACS Dissoziation	25 µg/ml L 0,5 mg/ml D	anti-CD45- Beads AM	$3,5 \times 10^6$ (n=9)	nein

Tabelle 4.2: Etablierung der Isolation von Lamina propria Leukozyten am Beispiel des Colons

Durch Veränderungen der mechanischen und enzymatischen Dissoziation des Gewebes sowie der Anreicherung wurde die Effektivität der Isolation von Leukozyten aus der LP des Colons optimiert (roter Rahmen: endgültiges Protokoll). Die Zellzahl lebender Leukozyten definierte die Effektivität, die Reinheit wurde mittels des durchflusszytometrischen Nachweises von in der LP nicht natürlich vorkommenden $\gamma\delta$ -T-Zellen bestimmt.

Zu Beginn der Etablierung waren sowohl die Vitalität als auch die Ausbeute der Leukozyten aus der cLP sehr gering, zudem fanden sich Kontaminationen mit Zellen aus dem Epithel (vor allem $\gamma\delta$ -T-Zellen). Über die in Tabelle 4.2 aufgeführten Veränderungen einzelner Abläufe des Vorverdaus und des enzymatischen Verdaus sowie der nachfolgenden Aufreinigung wurde die Ausbeute und die Vitalität der isolierten cLPL in dieser Arbeit wesentlich optimiert. Das finale Protokoll (rot markiert) wurde danach auch für die Isolierung von LPL aus dem Dünndarm angewandt. Hier stellte sich jedoch eine Aufreinigung mittels des 45%/75% Percoll-Gradienten als vorteilhafter für die Vitalität der Zellen heraus, weswegen diese Aufreinigung sowohl für die

LPL des Dünndarms als auch die IEL aus Dick- und Dünndarm verwendet wurde (siehe Abb. 4.11).

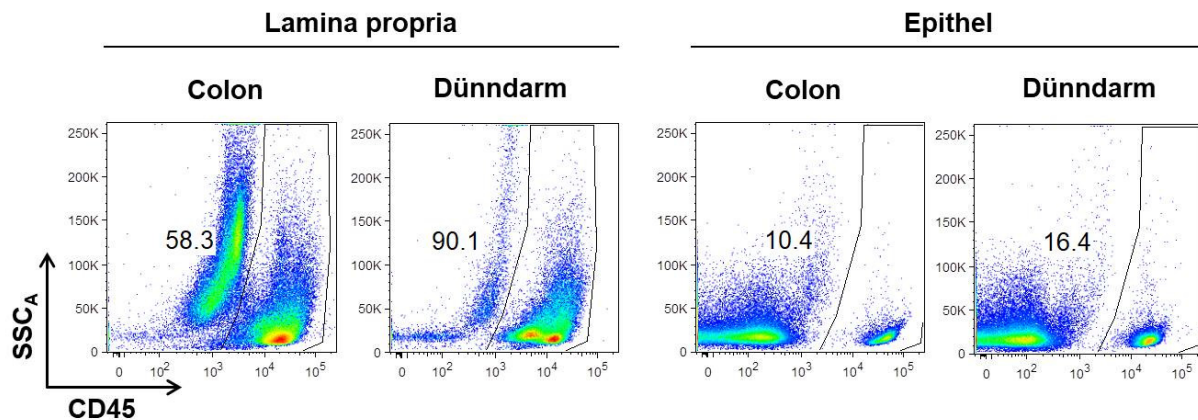


Abb. 4.11: Isolation von Leukozyten aus LP und Epithel des Colons und Dünndarmes

Anhand des neu etablierten Protokolls (ausführlich beschrieben in Abschnitt 3.2.2.4) wurden Leukozyten aus Colon und Dünndarm isoliert, auf CD45 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Repräsentative FACS-Plots (hier aus BALB/c Mäusen) der angereicherten Leukozyten aus Lamina propria und Epithel von Colon und Dünndarm nach Eingrenzung auf lebende (DAPI-negative) Zellen.

4.2.2 Analyse gastrointestinaler Leukozyten aus unbehandelten Mäusen

Um die durch die Konditionierung, die KMT sowie die sich entwickelnde aGVHD hervorgerufenen Veränderungen in der zellulären Zusammensetzung der Leukozytenpopulationen einzelner Darmabschnitte beurteilen und einordnen zu können, wurden diese zuerst in unbehandelten Spender- (BALB/c) und Empfängertieren (CB6F1) bestimmt.

Wie bereits aus der Literatur (156) bekannt, unterschied sich die leukozytäre Zusammensetzung von Lamina propria und Epithel: während sich in der LP (siehe Abb. 4.12 A und C) neben $\alpha\beta$ -T-Zellen auch signifikante Mengen an B-Zellen und myeloiden Zellen befanden, setzten sich die intraepithelialen Leukozyten (IEL, siehe Abb. 4.12 B und D) vor allem aus $\alpha\beta$ - und $\gamma\delta$ -T-Zellen zusammen. In BALB/c-Tieren bestanden die Leukozyten in der LP des Colons mit $58,55 \pm 2,66\%$ zum größten Teil aus B-Zellen und zu $24,93 \pm 3,45\%$ aus $\alpha\beta$ T-Zellen und zu $16,52 \pm 1,13\%$ aus myeloiden Zellen (Abb. 4.12 C). In CB6F1-Mäusen war die Verteilung mit $16,23 \pm 2,63\%$ $\alpha\beta$ T-Zellen, $42,17 \pm 11,20\%$ B-Zellen und $38,60 \pm 10,47\%$ myeloiden Zellen leicht zugunsten myeloider Zellen verschoben. Diese wiesen auch eine etwas andere Verteilung hinsichtlich des Granulozytenanteils, aber auch der Ly6C⁺ Subpopulation auf, die in der Literatur als myeloide Suppressorzellen diskutiert werden (siehe Tabelle 4.3).

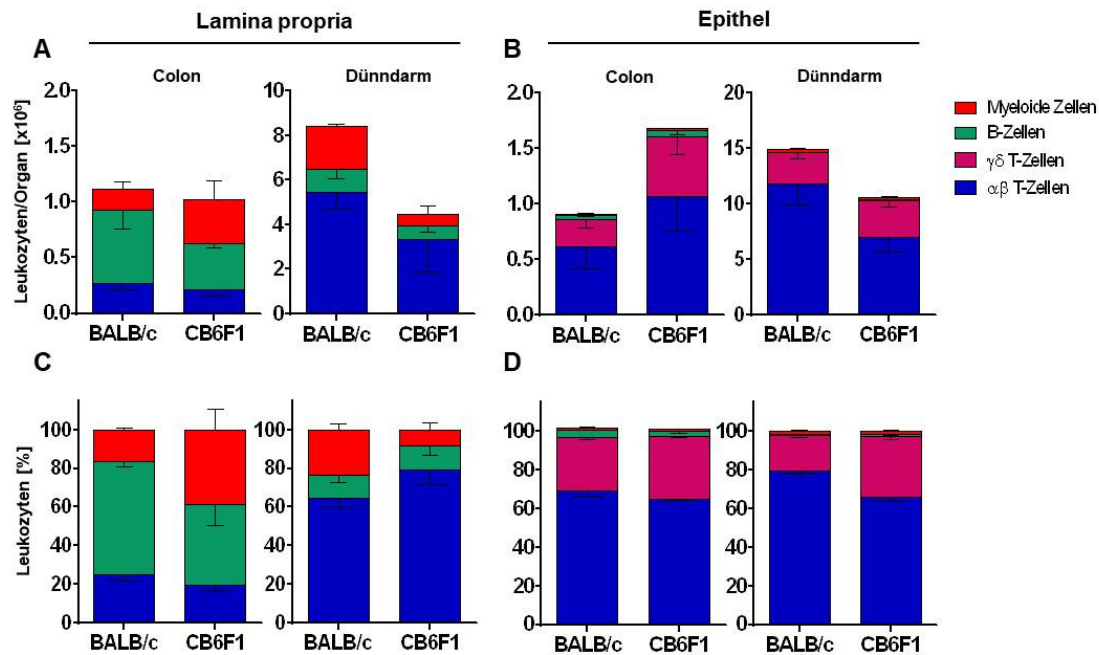


Abb. 4.12: Zusammensetzung der Leukozytenpopulationen aus dem GI-Trakt unbehandelter Spender- und Empfängermause

Die Leukozyten aus verschiedenen Bereichen des Darms von BALB/c und CB6F1 Mäusen wurden anhand des etablierten Protokolls isoliert und durchflusszytometrisch untersucht. Dargestellt sind absolute Leukozytenzahlen in der Lamina propria (A) und dem Epithel (B), sowie normalisierte, prozentuale Anteile der Leukozytenpopulationen in der Lamina propria (C) und dem Epithel (D) aus Colon und Dünndarm. MW \pm SEM von je 3 Zellpools aus wiederum je 3-5 Tieren.

Darmabschnitt - Mausstamm	Gr-1 ⁺ [%]	Ly6C ⁺ [%]	CD11c ⁺ [%]	Andere [%]
Colon BALB/c	2,19 \pm 0,42	18,97 \pm 1,91	53,77 \pm 12,38	25,07 \pm 13,53
Colon CB6F1	6,62 \pm 4,99	4,07 \pm 1,08	46,22 \pm 15,05	48,01 \pm 12,61
Dünndarm BALB/c	0,81 \pm 0,21	23,20 \pm 3,86	18,97 \pm 2,13	43,03 \pm 0,69
Dünndarm CB6F1	2,14 \pm 0,62	11,01 \pm 3,37	30,39 \pm 4,44	56,46 \pm 7,33

Tabelle 4.3: Subpopulationen der CD11b⁺ Zellen in der LP von Colon und Dünndarm unbehandelter Spender- und Empfängermause

Gezeigt sind die prozentualen Anteile der neutrophilen Granulozyten (Gr-1⁺), der Ly6-C⁺ Zellen und der CD11c⁺ dendritischen Zellen unter den CD11b⁺ myeloiden Zellen in der LP von Colon und Dünndarm aus BALB/c- und CB6F1-Tieren als MW \pm SEM (je 3 Zellpools aus je 3-5 Tieren).

Im Vergleich zum Colon fanden sich in der LP des Dünndarms in beiden Mausstämmen sowohl prozentual als auch absolut wesentlich mehr $\alpha\beta$ -T-Zellen (BALB/c: 64,66 \pm 4,88% CB6F1: 78,90 \pm 7,21%). Im Gegensatz dazu waren prozentual deutlich weniger B-Zellen in der LP des Dünndarms im Vergleich zur cLP vorhanden (BALB/c: 11,79 \pm 3,85% CB6F1: 12,82 \pm 4,83%). Der Prozentsatz an myeloiden Zellen unterschied sich signifikant zwischen den Mausstämmen und war in BALB/c-Tieren mit 23,55 \pm 3,26% deutlich höher als in CB6F1-Tieren mit 8,28 \pm 3,43%. Diese Verteilung stand im Gegensatz zur Verteilung in der LP des Colons, in der in CB6F1-Tieren prozentual mehr myeloide Zellen nachgewiesen wurden als in BALB/c-Tieren.

Die intraepithelialen Leukozyten von Colon und Dünndarm (siehe Abb. 4.12 B und D) bestanden in beiden Mausstämmen hauptsächlich aus $\alpha\beta$ - und $\gamma\delta$ -T-Zellen, wobei jeweils eine 2/3 ($\alpha\beta$ -T-Zellen) zu 1/3 ($\gamma\delta$ -T-Zellen) Verteilung auftrat. B-Zellen und myeloide Zellen machten lediglich einen sehr geringen Anteil aus. In absoluten Zellzahlen befand sich im Epithel des Dünndarms eine wesentlich größere Anzahl an Leukozyten als im Epithel des Colons.

Die Zusammensetzung der $\alpha\beta$ -T-Zellen im Darm zeigte im Vergleich zu T-Zellen in der Zirkulation und in den lymphatischen Geweben deutliche Unterschiede, weshalb diese im Folgenden detailliert analysiert wurden (siehe Abb. 4.13).

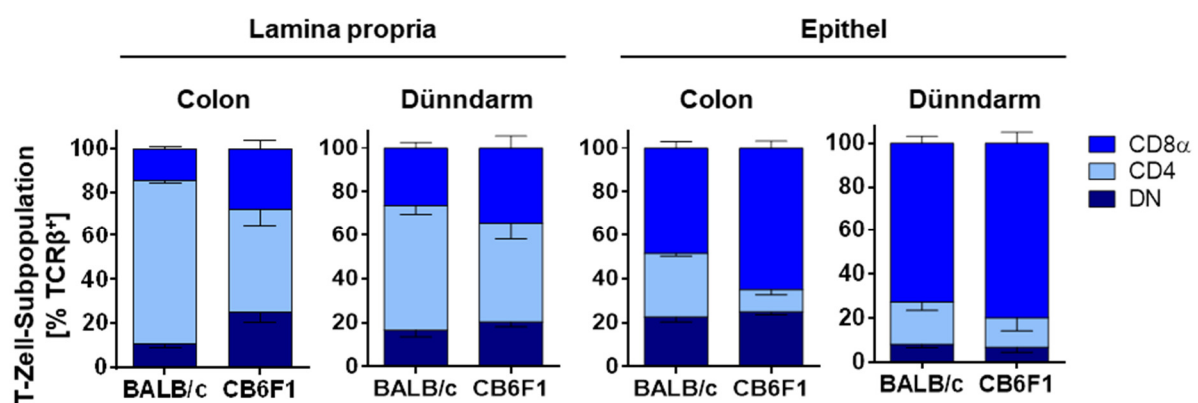


Abb. 4.13: Zusammensetzung der $\alpha\beta$ -T-Zellpopulation im GI-Trakt

Die in Abb. 4.12 dargestellten Leukozytenpopulationen von BALB/c und CB6F1 wurden durchflusszytometrisch weiter charakterisiert. Hierfür wurden Antikörper für die Oberflächenmoleküle CD4 und CD8α verwendet und auf TCRβ⁺ Zellen gegatet. Dies ermöglichte die Unterscheidung der verschiedenen Subpopulationen von $\alpha\beta$ T-Zellen: CD4⁺CD8α⁻ DN (dunkelblau), CD4⁺ einzeln positive (hellblau) und CD8α⁺ einzeln positive (mittelblau). MW ± SEM von je n=3 Zellpools aus je n=3-5 Einzelmäusen.

Die $\alpha\beta$ -T-Zellen enthielten in allen untersuchten Kompartimenten des Darms einen deutlichen Anteil an TCRβ⁺CD4⁺CD8α⁻ T-Zellen (DN). Dieser lag zwischen 7% (CB6F1 Epithel Dünndarm) und 25% (CB6F1 Epithel Colon). Darüber hinaus bestanden die $\alpha\beta$ -T-Zellen in der LP präferentiell aus CD4⁺ Zellen (zwischen 45% in der LP des Dünndarms aus CB6F1- und 74% in cLP aus BALB/c-Tieren), während sich im Epithel mit einem Anteil von 48% (BALB/c Epithel Colon) bis 79% (CB6F1 Epithel Dünndarm) der größte Anteil der $\alpha\beta$ -T-Zellen aus CD8α⁺ Zellen zusammensetzte. Im Folgenden wurden die CD4⁺ $\alpha\beta$ -T-Zellen in LP und Epithel (siehe Abb. 4.14) sowie die intraepithelialen CD8α⁺ $\alpha\beta$ -T-Zellen (siehe Abb. 4.15) genauer charakterisiert.

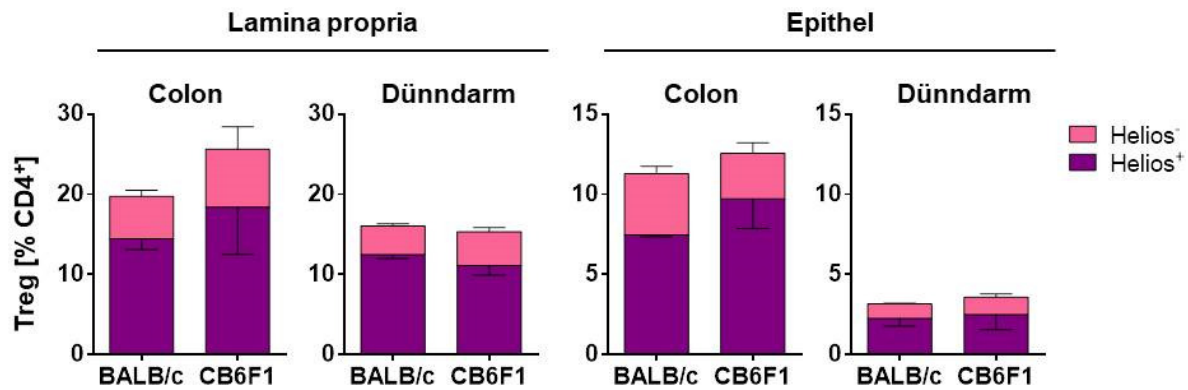


Abb. 4.14: Treg-Subpopulationen unter CD4⁺ αβ-T-Zellen im GI-Trakt

Leukozyten aus den genannten Darmabschnitten von BALB/c- und CB6F1-Tieren wurden durchflusszytometrisch analysiert. Treg wurden über ihre Foxp3-Expression identifiziert und in Helios⁺ (lila) oder Helios⁻ (pink) Subpopulationen unterteilt. Gezeigt sind MW ± SEM von je 3 Zellpools aus je 3-5 Tieren.

Der Anteil an Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen unter CD4⁺ αβ-T-Zellen lag je nach Mausstamm in der LP des Colons bei etwa 20-25% und war damit im Vergleich zu den meisten lymphatischen Organen (mit Ausnahme des KM) überdurchschnittlich hoch. In der LP des Dünndarms und dem Epithel des Colons war der prozentuale Anteil an Treg mit 10-15% deutlich geringer als in der LP des Colons und lag im Epithel des Dünndarms mit etwa 3% auf einem sehr niedrigen Niveau. Die Foxp3⁺ Treg-Zellen setzten sich in allen Organen etwa zu 2/3 aus Helios⁺ vermeintlichen tTreg und 1/3 Helios⁻ pTreg zusammen. Mit 34% machten Helios⁻ Treg-Zellen den größten Anteil im Epithel des Colons von BALB/c-Mäusen und mit 22% den geringsten Anteil in der LP des Dünndarms von BALB/c-Mäusen aus.

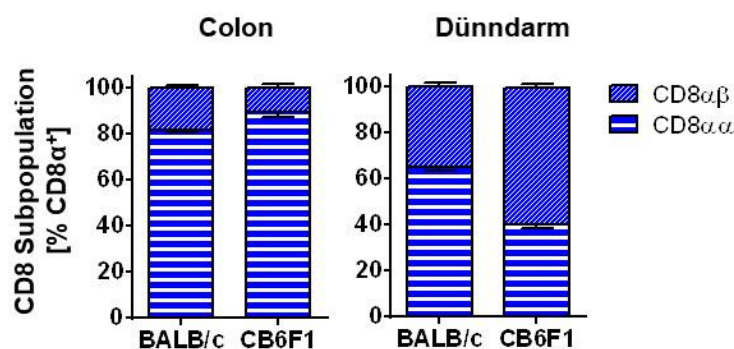


Abb. 4.15: Zusammensetzung der intraepithelialen CD8α⁺ αβ-T-Zellen im GI-Trakt

Leukozyten aus den genannten Darmabschnitten von BALB/c- und CB6F1-Tieren wurden durchflusszytometrisch analysiert. CD8α⁺ αβ-T-Zellen wurden über ihre Expression von TCRβ und CD8α identifiziert und in CD8αα⁺ sogenannte natürliche IEL (quergestreift) oder konventionelle CD8αβ⁺ T-Zellen (schräg gestreift) unterteilt. Gezeigt sind MW ± SEM von je 3 Zellpools aus je 3-5 Tieren.

Die TCRβ⁺CD8α⁺ T-Zellpopulation im Darmepithel bestand aus CD8αα⁺, den sogenannten natürlichen IEL und CD8αβ⁺ konventionellen T-Zellen (Abb. 4.15). In unbehandelten Tieren lag der Anteil an CD8αα⁺ T-Zellen mit 81,67 ± 1,38% (BALB/c) bzw. 89,13 ± 1,82% (CB6F1) im Epithel des Colons wesentlich höher als im Epithel des Dünndarms mit 64,97 ± 1,75% (BALB/c) bzw. 39,77 ± 1,40 (CB6F1).

4.3 Haploidente Knochenmarktransplantation und Treg-Therapie

4.3.1 Transplantationsschema

Für die nachfolgenden *in vivo* Versuche zur Therapie einer bereits bestehenden aGVHD wurde ein haploidentes Transplantationsmodell (ein sogenanntes ‚parent \rightarrow F1‘ Modell) gewählt. Hierbei erhielten CB6F1-Empfängertiere entweder Knochenmarkzellen alleine (KM-Kontrolle) oder in Kombination mit Milzzellen (GVHD) von Tieren des Elternstammes BALB/c. Während die KM-Zellen in erster Linie der Rekonstitution der letal bestrahlten Empfängertiere dienten, induzierten die in den Milzzellen enthaltenen reifen konventionellen T-Zellen eine aGVHD.

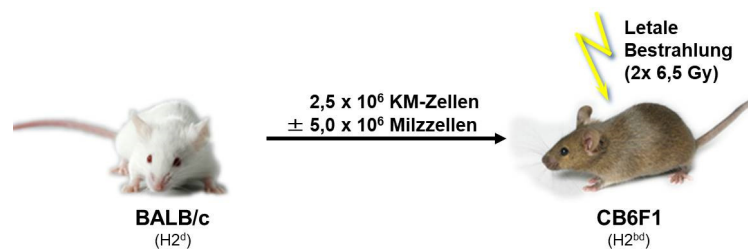


Abb. 4.16: Mausmodell der haploidenten Knochenmarktransplantation (BALB/c \rightarrow CB6F1)

CB6F1-Rezipienten (10 Wochen alt) wurden letal bestrahlt (2x 6,5 Gy) und entweder mit $2,5 \times 10^6$ Knochenmarkzellen alleine (KM-Kontrolle) oder zusammen mit $5,0 \times 10^6$ Milzzellen (GVHD) des Elternstammes BALB/c transplantiert. Die Zellgabe erfolgte intravenös über die Schwanzvene.

Die klinische Symptomatik der transplantierten Tiere wurde engmaschig anhand des bewährten Bewertungsschemas nach Cooke et al. (220) überwacht, das Fell- und Hautveränderungen, krankheitsbedingte Änderungen der Körperhaltung (Kyphose) sowie Gewichts- und Mobilitätsverluste berücksichtigt. Darüber hinaus wurden lymphatische (KM, Milz, Lymphknoten) und gastrointestinale Gewebe (Lamina propria und Epithel von Colon und Dünndarm) zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transplantation durchflusszytometrisch, molekularbiologisch und histologisch auf pathologische Veränderungen im Sinne einer aGVHD untersucht.

4.3.2 Manifestation einer aGVHD mit starker Darmbeteiligung im haploidenten KMT-Modell an d11 nach Transplantation

In Vorarbeiten von Tina Böld (AG Edinger, UKR) wurde bereits eine engmaschige Kinetik des aGVHD-Verlaufs im haploidenten KMT-Modell (BALB/c \rightarrow CB6F1) von d5 bis d21 nach KMT durchgeführt, die als Grundlage für die Wahl des Therapiezeitpunktes dienten und daher kurz erläutert werden. Berücksichtigt wurden die klinische Symptomatik und der Gewichtsverlust der Empfängertiere (siehe Abb. 4.17). Außerdem wurden Milz und KM an unterschiedlichen Zeitpunkten nach KMT entnommen und der T-Zell-Influx in diese Organe (siehe Abb. 4.18) untersucht.

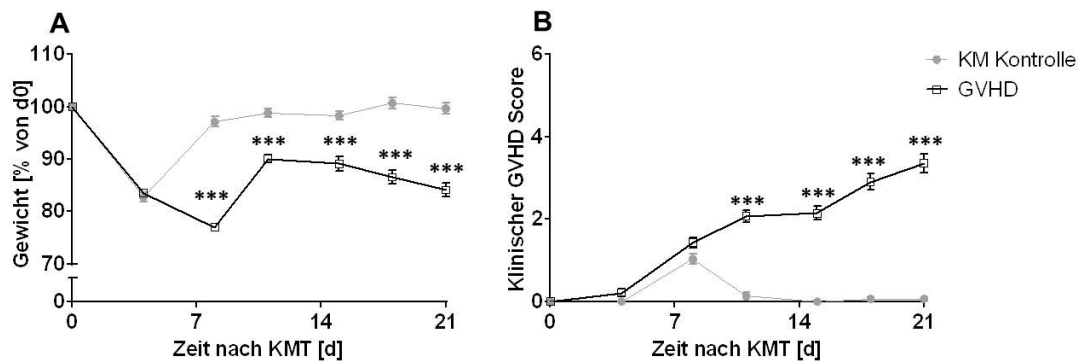


Abb. 4.17: Körpergewicht und klinischer GVHD-Score nach haploidenter KMT

Veränderungen des Körpergewichtes in Vergleich zu d0 (A) und klinischer GVHD Score (B) von CB6F1-Rezipienten nach haploidenter KMT. Die CB6F1 Empfängermause wurden nach letaler Bestrahlung $2,5 \times 10^6$ Knochenmarkzellen (BALB/c) alleine (●, KM-Kontrolle, $n=15$), oder zusammen mit $5,0 \times 10^6$ BALB/c Milzzellen für die Induktion einer aGVHD (□, GVHD, $n=21$) transplantiert. Dargestellt sind MW \pm SEM. (***) $p < 0,001$. Daten von Tina Böld (AG Edinger, UKR)

Durch die Aktivierung und Expansion alloreaktiver T-Zellen entwickelten Tiere, denen zusätzlich zu den KM-Zellen Milzzellen transplantiert worden waren, eine rasch voranschreitende aGVHD (siehe Abb. 4.17). Die Bestrahlung im Zusammenspiel mit der sich entwickelnden aGVHD führten bereits früh nach KMT (d8) zu einem Gewichtsverlust der GVHD-Tiere (auf $77,03 \pm 0,73\%$ des Ausgangsgewichts). Im Vergleich dazu verloren KM-Kontrolltiere nur initial an Gewicht, erreichten an d8 nach KMT bereits wieder nahezu ihr Ausgangsgewicht ($97,13 \pm 0,96\%$) und hielten dieses oder nahmen im Vergleich zum d0 sogar noch an Gewicht zu. An d11 nach KMT zeigten auch GVHD-Tiere eine leichte Erholung im Vergleich zu d8 ($90,03 \pm 0,75\%$), verloren danach jedoch wieder kontinuierlich an Gewicht. Der klinische GVHD-Score stieg in diesen Tieren stetig an, bis er an d21 nach KMT einen Wert von $3,36 \pm 0,23$ erreichte. Signifikante Unterschiede zu den KM-Tieren waren jedoch bereits ab d11 nach KMT zu beobachten (GVHD: $2,07 \pm 0,14$; KM-Kontrolle: $0,13 \pm 0,09$).

Um die Auswirkungen der Kotransplantation von Milzzellen auf die Immunrekonstitution und die zelluläre Zusammensetzung in KM und Milz nach haploidenter KMT einordnen zu können, wurden diese Organe zwischen d5 und d14 nach KMT entnommen, die Leukozyten isoliert und die Anzahl der infiltrierenden T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt (Abb. 4.18).

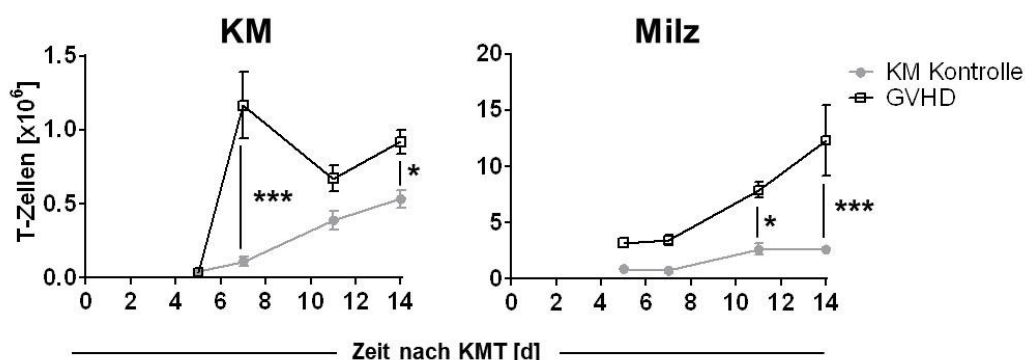


Abb. 4.18: T-Zellzahl in KM und Milz nach haploidenter KMT

CB6F1-Empfängermäuse wurden nach letaler Bestrahlung $2,5 \times 10^6$ Knochenmark-Zellen (BALB/c) alleine (●, KM-Kontrolle), oder zusammen mit $5,0 \times 10^6$ BALB/c Splenozyten (□, GVHD) transplantiert. Die Leukozyten von KM (2 Hinterläufe) und Milz der Rezipienten wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach haploidenter KMT durchflusszytometrisch auf den Gehalt an TCR β^+ T-Zellen untersucht. Dargestellt sind MW \pm SEM von je $n=3$ Tieren/Gruppe/Zeitpunkt ($p<0,05$; *** $p<0,001$). Daten von Tina Böld (AG Edinger, UKR)*

An d5 nach KMT zeigte sich in beiden Gruppen eine geringe Anzahl an T-Zellen. Während die T-Zellzahlen in KM-Kontrolltieren im Rahmen der Regeneration langsam anstiegen, war in GVHD-Tieren bereits früh nach GVHD-Induktion ein massiver Influx von Spender-T-Zellen zu sehen. Im KM war bereits an d7 eine um etwa 10-fach erhöhte T-Zellzahl detektierbar ($1,17 \pm 0,22 \times 10^6$ in GVHD- und $0,11 \pm 0,03 \times 10^6$ T-Zellen in KM-Kontrolltieren), die bis d14 im Vergleich zu KM-Kontrolltieren um den Faktor 2 erhöht blieb. In der Milz von GVHD-Tieren war die T-Zellzahl schon an d5 nach KMT um den Faktor 3 erhöht ($3,21 \pm 0,26 \times 10^6$ in GVHD- und $0,89 \pm 0,23 \times 10^6$ T-Zellen in KM-Kontrolltieren). Die T-Zellzahl in die Milz von GVHD-Tieren stieg weiter an, war ab d11 nach KMT signifikant höher als in KM-Kontrolltieren und erreichte seinen Maximalwert an d14 mit einer 4,6-fachen Erhöhung ($12,32 \pm 3,16 \times 10^6$ T-Zellen in GVHD- und $2,65 \pm 0,19 \times 10^6$ T-Zellen in KM-Kontrolltieren).

Insgesamt zeigten die Empfängertiere der GVHD-Gruppe an d11 nach haploidenter KMT bereits deutliche klinische Symptome und eine starke Infiltration von Spender-T-Zellen in KM und Milz, weshalb dieser Zeitpunkt für die Gabe *in vitro* expandierter Spender-Treg-Zellen gewählt wurde. Zum Nachweis GVHD-typischer Gewebeschäden in Haut, Leber und GI-Trakt wurden diese GVHD-Zielorgane an d11 zusätzlich histologisch untersucht (siehe Abb. 4.19).

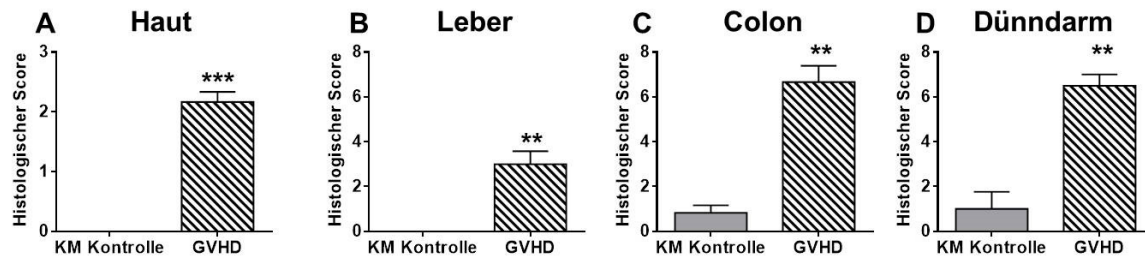


Abb. 4.19: Histopathologische Analyse von Mäusen mit bzw. ohne GVHD an d11 nach haploidenter KMT

Elf Tage nach Transplantation von KM- (KM-Kontrolle) bzw. KM- und Milzzellen (GVHD) erfolgte eine histologische Untersuchung anhand von H/E-gefärbten Paraffinschnitten der GVHD-Zielorgane Haut (A), Leber (B), Colon (C) und Dünndarm (D) (durchgeführt von Elisabeth Huber, Institut für Pathologie, UKR). Gezeigt sind MW \pm SEM von je $n=3$ Tieren/Gruppe. (** $p<0,01$, *** $p<0,001$).

Die histopathologische Evaluation berücksichtigt in erster Linie strukturelle Schäden sowie leukozytäre Infiltrate. Der maximal erreichbare Wert lag hierbei für die Haut bei 3 und für Leber und Darm bei 8. GVHD-Tiere zeigten an d11 nach KMT in der Haut des Nackenbereichs bereits einen relativ hohen Score von $2,17 \pm 0,17$ und in der Leber einen milderen Score von $3,00 \pm 0,58$. Die gravierendsten Veränderungen waren jedoch im Colon und Dünndarm zu sehen. Hier zeigten GVHD-Tiere bereits einen annähernd maximalen Score mit $6,67 \pm 0,73$ im Colon und $6,5 \pm 0,50$ im Dünndarm, während KM-Kontrolltiere lediglich geringe pathologische Veränderungen aufwiesen.

Ein Parameter des histopathologischen Scores beschreibt Art und Ausmaß der leukozytären Infiltrate. Um diese weitergehend zu charakterisieren, wurden Leukozyten aus der Lamina propria und dem Epithel des Colons und Dünndarms isoliert (siehe Abb. 4.20) und durchflusszytometrisch bezüglich ihrer Zusammensetzung analysiert (siehe Abb. 4.21).

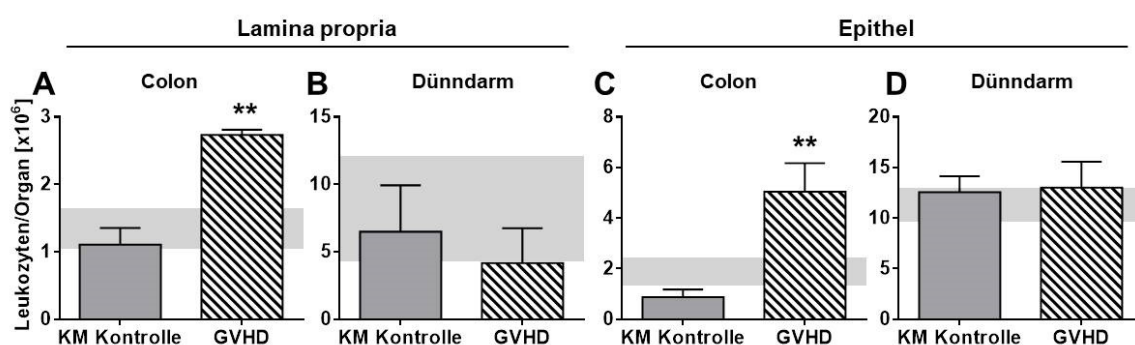


Abb. 4.20: Leukozytengehalt in verschiedenen GI-Kompartimenten an d11 nach KMT

An d11 nach KMT wurden Colon und Dünndarm von GVHD- und KM-Kontrollmäusen entnommen und daraus Leukozyten anhand des etablierten Protokolls isoliert. Gezeigt sind absolute Zellzahlen von Leukozyten aus der LP von Colon (A) und Dünndarm (B) sowie dem Epithel von Colon (C) und Dünndarm (D) als MW \pm SEM von 3-12 Zellpools aus je 3-5 Tieren (** $p<0,01$). Graue Balken indizieren MW \pm SEM des Leukozytengehalts nicht-transplantierte CB6F1-Mäuse.

Die in Abb. 4.19 D gezeigten histopathologischen Veränderungen des Dünndarms in GVHD-Tieren beruhten zum größeren Teil auf dem Auftreten von Apoptosen und weniger auf entzündlicher Zellinfiltration des Gewebes (nicht gezeigt). Dies deckte sich mit den

Ergebnissen nach separater Isolierung der Leukozyten aus LP (Abb. 4.20 B) und Epithel (Abb. 4.20 D) des Dünndarms. Hier waren keine Unterschiede zwischen Rezipienten mit und ohne aGVHD zu erkennen und die Werte lagen jeweils im Bereich der Mengen von nicht-transplantierten Kontrolltieren.

In LP (Abb. 4.20 A) und Epithel (Abb. 4.20 C) des Colons zeigten GVHD-Tiere hingegen einen im Vergleich zu KM-Kontrolltieren 3-fach (LP) bzw. 6-fach (Epithel) erhöhten Leukozytengehalt, der damit auch deutlich über dem Normalspiegel nicht-transplantierte Tiere lag. Um diese Zellinfiltrate des GI-Traktes genauer zu charakterisieren wurden sie durchflusszytometrisch untersucht (siehe Abb. 4.21).

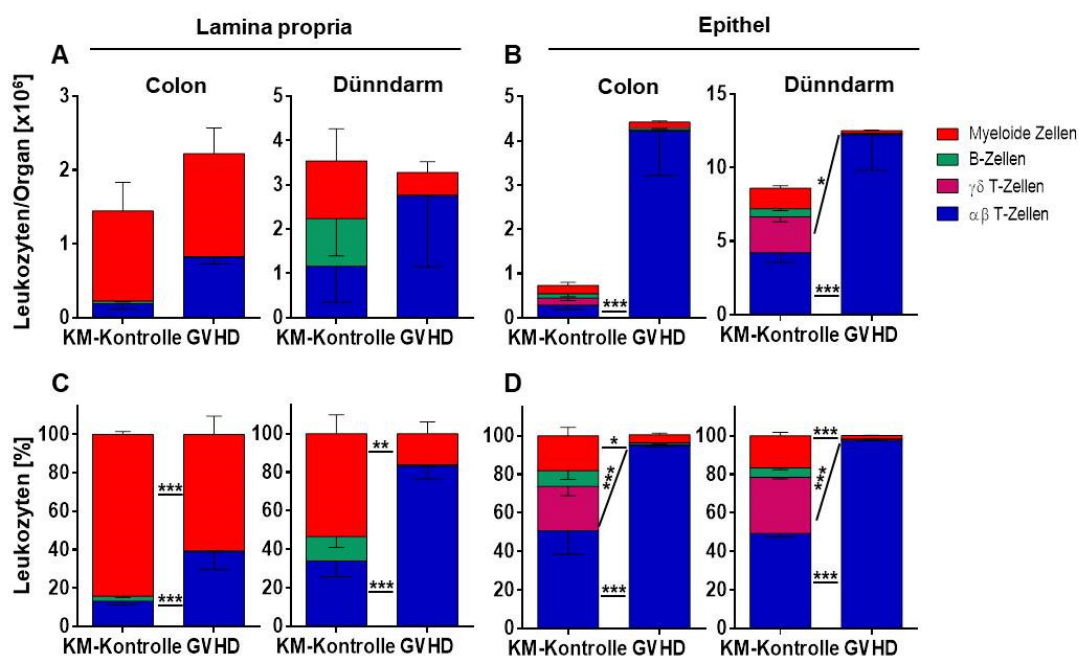


Abb. 4.21: Zusammensetzung der Leukozytenpopulationen aus dem GI-Trakt von KM-Kontroll- und GVHD-Tieren an d11 nach haploidenter KMT

Leukozyten aus verschiedenen Bereichen des Darms von GVHD- und KM-Kontrollmäusen wurden 11 Tage nach KMT anhand des etablierten Protokolls isoliert, auf CD45 als Panleukozytenmarker sowie TCR β ($\alpha\beta$ -T-Zellen), CD19 (B-Zellen), TCR $\gamma\delta$ ($\gamma\delta$ -T-Zellen) und CD11b (myeloide Zellen) gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Absolute Leukozytenzahlen in der Lamina propria (A) und dem Epithel (B), sowie der normalisierte, prozentuale Anteil dieser Leukozytenpopulationen in der Lamina propria (C) und dem Epithel (D) aus Colon und Dünndarm. Gezeigt sind MW \pm SEM von je 3-12 Zellpools aus wiederum je 3-5 Tieren (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Bei der durchflusszytometrischen Analyse des Infiltrats (Abb. 4.21) zeigte sich nicht nur in den GVHD-, sondern auch in den KM-Kontrolltieren ein deutlicher Effekt der Konditionierung und nachfolgenden KMT auf dessen Zusammensetzung im Vergleich zu nicht-transplantierten Kontrolltieren (siehe Abb. 4.12). So kam es in der LP des Colons von KM-Kontrolltieren (Abb. 4.21 A und C) als Folge der Konditionierung zu einem deutlichen Verlust der B-Zellen ($2,54 \pm 0,48\%$ versus $42,17 \pm 11,20\%$ in nicht-transplantierten Kontrolltieren). Dementsprechend bestand das leukozytäre Infiltrat in der cLP hauptsächlich aus $\alpha\beta$ -T-Zellen und myeloiden Zellen. Auch in der LP des Dünndarms (Abb. 4.21 A und C), sowie dem Epithel des Colons

und des Dünndarms (Abb. 4.21 B und D) kam es in Folge der Bestrahlung und KMT bereits ohne aGVHD zu einer Erhöhung des Anteils an myeloiden Zellen. Der Anteil an $\gamma\delta$ -T-Zellen im Epithel von Colon und Dünndarm war jedoch mit etwa 20-30% in einem ähnlichen Bereich wie in nicht-transplantierten Kontrolltieren. Wurde in den Rezipienten eine aGVHD induziert, so verschob sich die leukozytäre Zusammensetzung der verschiedenen Kompartimente im Vergleich zu KM-Kontrolltieren signifikant. Der Verlust der B-Zellen verstärkte sich in Folge der aGVHD, sodass in allen Darmkompartimenten weniger als 1% B-Zellen vorhanden waren. Im Vergleich zu KM-Kontrolltieren bestand in der LP von Colon und Dünndarm (Abb. 4.21 C) ein signifikant höherer Anteil des Infiltrats aus $\alpha\beta$ -T-Zellen. Diese machten im Colon $38,97 \pm 9,32\%$ in GVHD- versus $13,11 \pm 1,88\%$ in KM-Kontrolltieren und im Dünndarm sogar $83,18 \pm 6,71\%$ in GVHD- versus $33,88 \pm 8,14\%$ in KM-Kontrolltieren aus. Gleichzeitig war der Anteil an myeloiden Zellen sowohl in der LP des Colons als auch des Dünndarms signifikant geringer. Das Leukozyteninfiltrat in den Epithelien von Colon und Dünndarm der GVHD-Tiere (Abb. 4.21 D) bestand beinahe ausschließlich aus $\alpha\beta$ -T-Zellen ($95,02 \pm 0,79\%$ im Colon und $97,63 \pm 0,20\%$ im Dünndarm), während $\gamma\delta$ -T-Zellen aus den Epithelien von Colon ($0,36 \pm 0,12\%$) und Dünndarm ($0,33 \pm 0,11\%$) fast komplett verschwanden.

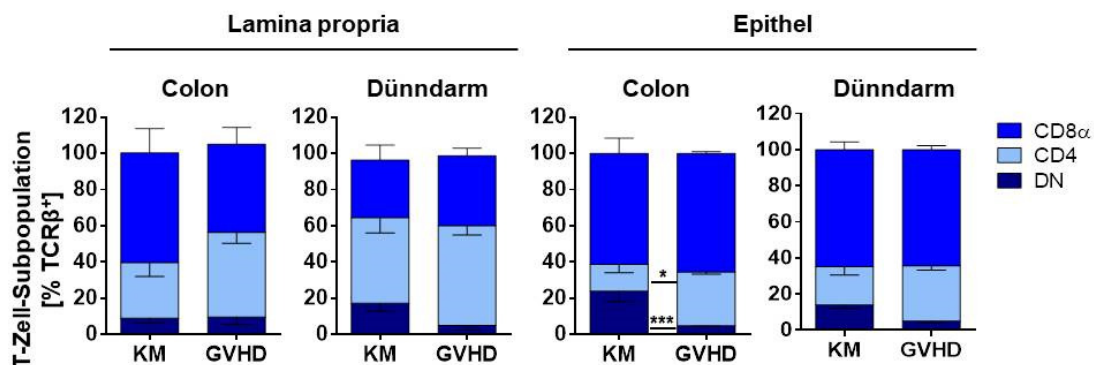


Abb. 4.22: Zusammensetzung der intestinalen $\alpha\beta$ -T-Zellpopulation von KM-Kontroll- und GVHD-Tieren an d11 nach haploidenter KMT

Intestinale $\alpha\beta$ -T-Zellen von Rezipienten nach KMT ohne (KM) oder mit GVHD (GVHD) wurden an d11 nach KMT durchflusszytometrisch charakterisiert. Hierfür wurden die Zellen aus den jeweiligen Kompartimenten isoliert und mit Antikörpern für CD45, TCR β , CD4 und CD8 α markiert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an CD4 $^+$ CD8 α^+ (DN, dunkelblau), CD4 $^+$ (hellblau) und CD8 α^+ (mittelblau) Zellen unter TCR β^+ T-Zellen. MW \pm SEM von je 3-12 Zellpools aus je n=3-5 Tieren (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

Betrachtete man die Zusammensetzung der $\alpha\beta$ -T-Zellen in den einzelnen Darmkompartimenten von KM-Kontroll- und GVHD-Tieren bezüglich der Expression der Korezeptoren CD8 α oder CD4 (Abb. 4.22), so kam es in GVHD-Tieren mit Ausnahme der LP des Colons zu einem Rückgang des Anteils der DN-T-Zellen. Dieser erreichte allerdings nur im Epithel des Colons statistische Signifikanz (von $23,93 \pm 5,70\%$ in KM-Kontroll- auf $4,81 \pm 0,43\%$ in GVHD-Tieren), begleitet von einem ebenfalls signifikanten Anstieg des CD4 $^+$ T-Zellanteils (von $14,75 \pm 4,60\%$ in KM-Kontroll- auf $29,60 \pm 1,18\%$ in GVHD-Tieren).

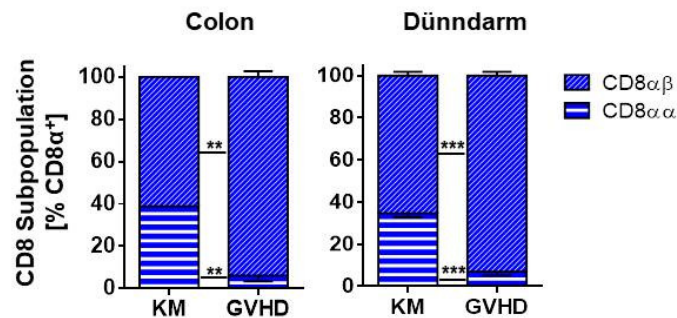


Abb. 4.23: Zusammensetzung der intestinalen, epithelialen CD8α⁺ αβ-T-Zellpopulation von KM-Kontroll- und GVHD-Tieren an d11 nach haploidenter KMT

Intestinale αβ-T-Zellen von Rezipienten nach KMT ohne (KM) oder mit GVHD (GVHD) wurden an d11 nach KMT durchflusszytometrisch charakterisiert. Hierfür wurden die Zellen aus den jeweiligen Kompartimenten isoliert und mit Antikörpern für CD45, TCRβ, CD8α und CD8β markiert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an natürlichen IEL (CD8αα⁺, quergestreift) und konventionellen CD8-T-Zellen (CD8αβ⁺, schräg gestreift). MW ± SEM von je 1-9 Zellpools aus je 3-5 Tieren (** p<0,01; *** p<0,001).

Während in nicht-transplantierten CB6F1-Tieren (siehe Abb. 4.15) ein Großteil der epithelialen CD8α⁺ αβ-T-Zellen das CD8αα-Homodimer exprimierten (89,13 ± 1,82% im Colon und 39,77 ± 1,40 im Dünndarm) und damit den natürlichen IEL zugeordnet werden konnten, war diese Population an d11 nach haploidenter KMT sowohl in Tieren ohne als auch mit aGVHD deutlich reduziert, wobei der Effekt bei Auftreten einer aGVHD wesentlich ausgeprägter war (Abb. 4.23).

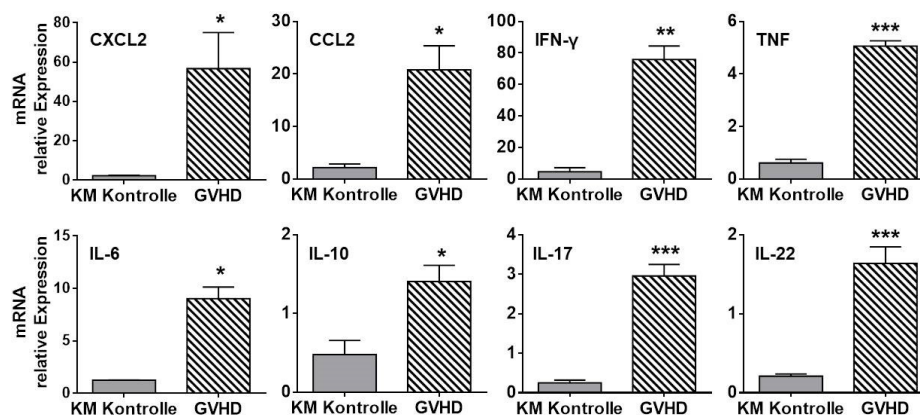


Abb. 4.24: mRNA-Spiegel verschiedener Chemokine und Zytokine im Colon von KM-Kontroll- und GVHD-Tieren an d11 nach haploidenter KMT

1/3 des Colons von KM-Kontroll- und GVHD-Tieren wurde an d11 nach KMT für die Gewinnung von mRNA eingesetzt. Diese wurde in cDNA umgeschrieben und mittels qRT-PCR analysiert. HPRT diente als 'housekeeping'-Gen. Dargestellt ist die Erhöhung der jeweiligen mRNA-Spiegel im Vergleich zu denen in nicht-transplantierten Tieren (arbiträr auf 1 gesetzt) als MW ± SEM (n=3; * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001).

Der massive Influx von αβ T-Zellen, aber auch von myeloiden Zellen in das Colon an d11 nach aGVHD-Induktion (siehe Abb. 4.21) spiegelte sich auch durch erhöhte mRNA-Spiegel verschiedener Chemokine und pro-inflammatorischer Zytokine wider (Abb. 4.24). So war die Expression der Chemokine CXCL2 und CCL2 56,7 ± 18,35-fach bzw. 20,79 ± 4,57-fach gegenüber der in nicht-transplantierten Tieren erhöht und die des pro-inflammatorischen Zytokins IFN-γ sogar 75,90 ± 8,58-fach. Aber auch für TNF (5,06 ± 0,19-fach) und IL-6 (10,75

$\pm 3,12$ -fach) wurde ein deutlicher Anstieg detektiert, wohingegen die immunregulatorischen Zytokine IL-10 ($1,41 \pm 0,20$ -fach), IL-17 ($2,96 \pm 0,29$ -fach) und IL-22 ($1,63 \pm 0,21$ -fach) nur leicht erhöht waren. Im Vergleich dazu zeigten Tiere ohne aGVHD mit Ausnahme von IFN- γ ($4,63 \pm 2,55$ -fach) nur mäßig erhöhte Werte für diese Chemokine und Zytokine im Vergleich zu unbehandelten Tieren.

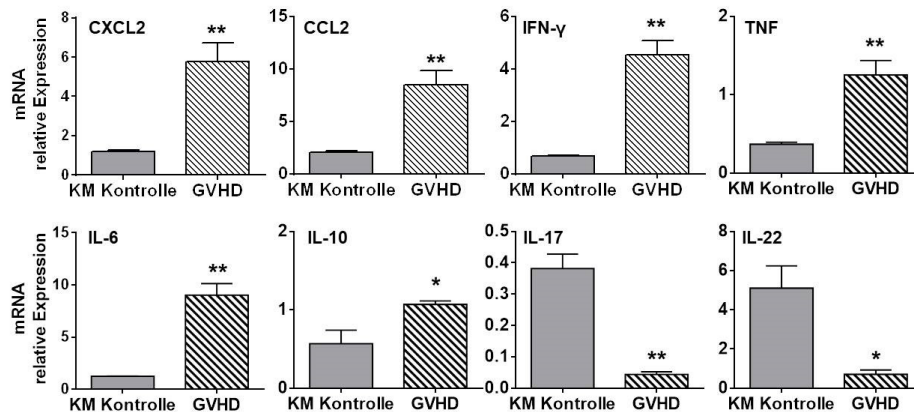


Abb. 4.25: mRNA-Spiegel verschiedener Chemokine und Zytokine im Dünndarm von KM-Kontroll- und GVHD-Tieren an d11 nach haploidenter KMT

1/3 des Dünndarms von KM-Kontroll- und GVHD-Tieren wurde an d11 nach KMT für die Gewinnung von mRNA eingesetzt. Diese wurde in cDNA umgeschrieben und mittels qRT-PCR analysiert. HPRT diente als ‚housekeeping‘-Gen. Dargestellt ist die Erhöhung der jeweiligen mRNA-Spiegel im Vergleich zu denen in nicht-transplantierten Tieren (arbiträr auf 1 gesetzt) als MW \pm SEM ($n=3$; * $p<0,05$, ** $p<0,01$).

Ähnlich wie im Colon von GVHD-Tieren konnte auch im Dünndarm anhand der mRNA-Expression verschiedener Chemokine und Zytokine ein inflammatorisches Milieu nachgewiesen werden (Abb. 4.25), das jedoch im Vergleich zum teilweise drastischen Anstieg im Colon (siehe Abb. 4.24) auf einem wesentlich geringeren Niveau lag. Die Expression der Chemokine CXCL2 und CCL2 war im Vergleich zu nicht-transplantierten Tieren $5,77 \pm 0,95$ -fach bzw. $8,46 \pm 1,36$ -fach erhöht. Die der pro-inflammatorischen Zytokine IFN- γ und IL-6 waren $4,53 \pm 0,54$ -fach und $9,04 \pm 1,10$ -fach erhöht, wohingegen die TNF- und IL-10-Spiegel in etwa auf dem Niveau nicht-transplantierte Tiere lagen. Die Expression von IL-17 und IL-22 war in GVHD Tieren gegenüber nicht-transplantierten Kontrolltieren sogar reduziert. Tiere ohne aGVHD zeigten für alle untersuchten Chemokine und Zytokine in etwa die gleichen Spiegel wie unbehandelte Tiere, lediglich IL-22 war $5,11 \pm 1,14$ -fach höher in KM-Kontrolltieren als in nicht-transplantierten Tieren.

In experimentellen und klinischen Studien wurde wiederholt eine Korrelation zwischen der Entwicklung einer aGVHD und dem Verlust von Paneth-Zellen sowie des hauptsächlich von diesen produzierten anti-mikrobiellen Lektins Reg3 γ gezeigt, weshalb diese Parameter auch im Modell der haploidenten KMT untersucht wurden (siehe Abb. 4.26).

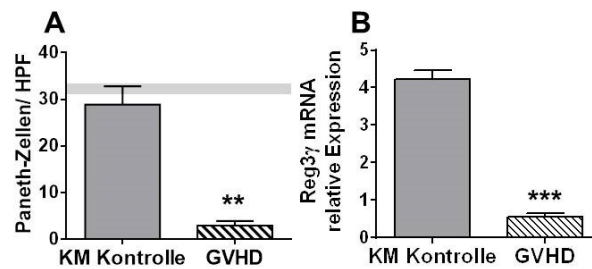


Abb. 4.26: Paneth-Zellen und Reg3γ mRNA-Spiegel im Dünndarm von KM-Kontroll- und GVHD-Tieren an d11 nach haploidenter KMT

Der Dünndarm von KM-Kontroll- und GVHD-Tieren wurde entnommen, zu 2/3 für die Paneth-Zell-quantifizierung nach H/E-Färbung (A) und zu 1/3 für die RNA-Isolierung und Reg3γ-Quantifizierung mittels qRT-PCR (B) mit HPRT als ‚housekeeping‘-Gen eingesetzt. Dargestellt ist die Erhöhung des mRNA-Spiegels im Vergleich zu nicht-transplantierten Tieren (arbiträr auf 1 gesetzt) als MW \pm SEM. Die Paneth-Zell-Auszählung pro HPF (Vergrößerung 40x) wurde freundlicherweise von Elisabeth Huber, Institut für Pathologie, UKR, durchgeführt (MW \pm SEM von je n=3, ** p<0,01, *** p<0,001).

Auch im haploidenten KMT-Modell zeigte sich in GVHD-Tieren an d11 nach KMT ein deutlicher Verlust an Paneth-Zellen (PZ) im Dünndarm (Abb. 4.26 A) sowie eine Reduktion der mRNA-Spiegel für Reg3γ (Abb. 4.26 B). Tiere, denen nur KM-Zellen transplantiert worden waren, zeigten eine normale Anzahl an Paneth-Zellen ($28,9 \pm 3,90$ PZ/HPF) und eine gesteigerte mRNA-Expression von Reg3γ ($4,23 \pm 0,23$ -fach) im Vergleich zu unbehandelten Tieren. Im Dünndarm von GVHD-Tieren waren hingegen mit $2,9 \pm 0,99$ PZ/HPF kaum Paneth-Zellen nachweisbar und auch die Reg3γ mRNA-Spiegel ($0,56 \pm 0,08$ -fach) waren deutlich verringert.

Da in den nachfolgenden Experimenten eine Therapie mit *in vitro* expandierten regulatorischen T-Zellen durchgeführt werden sollte, wurde schließlich die Treg-Frequenz unter CD4⁺ T-Zellen in unterschiedlichen Organen zum geplanten Therapiezeitpunkt genauer analysiert.

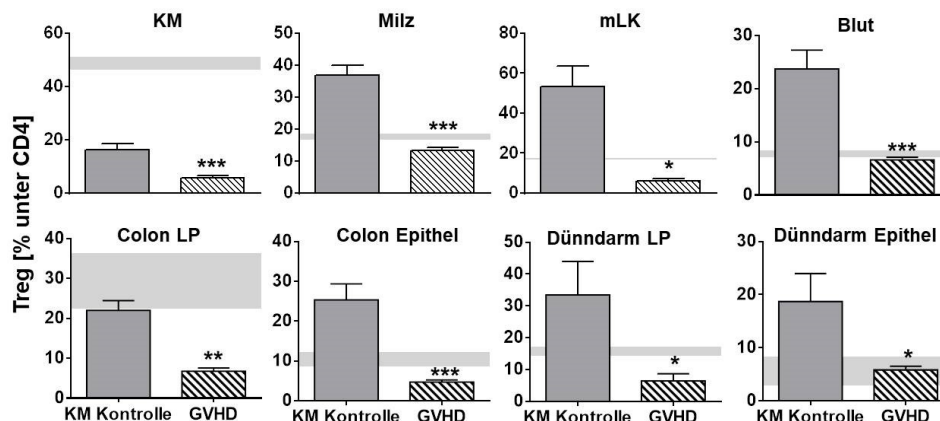


Abb. 4.27: Treg Frequenz unter CD4⁺ T-Zellen in verschiedenen Organen an d11 nach KMT

Aus KM-Kontroll- und GVHD-Tieren wurden an d11 nach KMT die angezeigten Organe entnommen, daraus Leukozyten isoliert, mit Antikörpern gegen CD4 und Foxp3 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Untersucht wurden peripheres Blut, primäre lymphatische Organe wie das Knochenmark (KM), sekundäre lymphatische Organe wie Milz und mesenteriale Lymphknoten (mLK) und die LPL und IEL von Colon und Dünndarm. Gezeigt ist der prozentuale Anteil an Treg (Foxp3⁺) unter CD4⁺ T-Zellen (n=3-25, * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001). Graue Balken indizieren MW \pm SEM von nicht-transplantierten CB6F1-Tieren.

Die Treg-Frequenz war in KM-Kontrolltieren in allen untersuchten Organen deutlich gegenüber nicht-transplantierten Tieren erhöht, mit Ausnahme der LP des Colons (mit $22,03 \pm 2,42\%$ knapp unterhalb des Normbereichs von $29,37 \pm 6,90\%$) und des KM (mit $16,12 \pm 2,40\%$ wesentlich unterhalb des Normbereichs von $48,63 \pm 2,50\%$). Im Unterschied hierzu lag die Treg-Frequenz in den einzelnen Organen von GVHD-Tieren durchweg signifikant niedriger als in den KM-Kontrolltieren und mit Ausnahme des Dünndarmepithels auch niedriger als in unbehandelten Tieren. Am deutlichsten war diese Reduktion im KM von GVHD-Tieren mit nur $5,77 \pm 0,77\%$ Treg im Vergleich zu $48,63 \pm 2,50\%$ in nicht-transplantierten Tieren zu sehen.

Zusammenfassend konnte also gezeigt werden, dass das gewählte haploidente Transplantationsmodell zu einer schweren aGVHD führte und an d11 sämtliche klinischen Symptome und histologischen Kriterien einer aGVHD vorlagen, insbesondere auch der GI-GVHD. Insofern erschien das Modell geeignet, die therapeutische Wirkung *in vitro* expandierter Spender-Treg-Zellen zu untersuchen.

4.3.3 Therapie einer bestehenden aGVHD durch adoptiven Transfer *in vitro* expandierter Spender Treg-Zellen

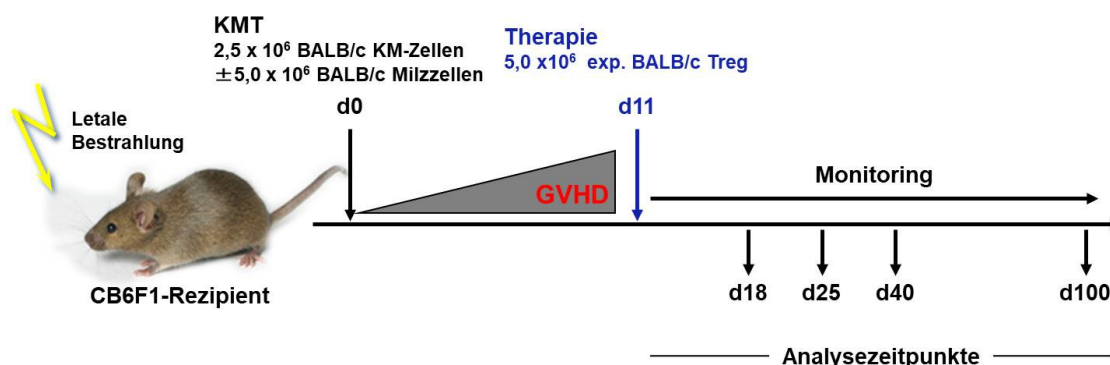


Abb. 4.28: Schema der Therapie einer etablierten aGVHD mit *in vitro* expandierten Spender Treg-Zellen

CB6F1-Rezipienten wurden, wie in Abb. 4.16 schematisch dargestellt, an d0 Knochenmark- und Milzzellen von BALB/c-Mäusen transplantiert. Nach stabiler Etablierung der aGVHD (d11) wurden einem Teil der GVHD-Tiere (Therapie) zusätzlich $5,0 \times 10^6$ *in vitro* expandierte Treg-Zellen des Spender-Mausstammes (BALB/c) injiziert, in einigen Versuchen erfolgte eine wiederholte Gabe an d18 nach KMT. Im weiteren Verlauf wurden die Mäuse regelmäßig evaluiert (Bestimmung des Körpergewichts sowie Einschätzung der klinischen Symptomatik anhand des GVHD-Scores). An den dargestellten Analysezeitpunkten wurde jeweils ein Teil der Tiere getötet, verschiedene primäre und sekundäre lymphatische Organe sowie Colon und Dünndarm entnommen und durchflusszytometrisch, histologisch und molekularbiologisch analysiert.

Wie im vorherigen Abschnitt ausführlich beschrieben, wurden CB6F1-Mäuse nach letaler Bestrahlung mit KM- und Milzzellen transplantiert und entwickelten daraufhin bis d11 nach KMT eine deutlich ausgeprägte aGVHD mit starker Darmbeteiligung. Für alle nachfolgenden Untersuchungen zur Treg-Therapie wurden daher einem zufällig ausgewählten Teil der GVHD-Tiere an d11 nach KMT *in vitro* expandierte Spender-Treg-Zellen injiziert. Der weitere Verlauf der aGVHD wurde engmaschig überwacht. Zu vorher festgelegten Zeitpunkten wurde

jeweils ein Teil der Tiere getötet und es erfolgte eine detaillierte histologische, immunologische und molekularbiologische Analyse einzelner Organe der Tiere.

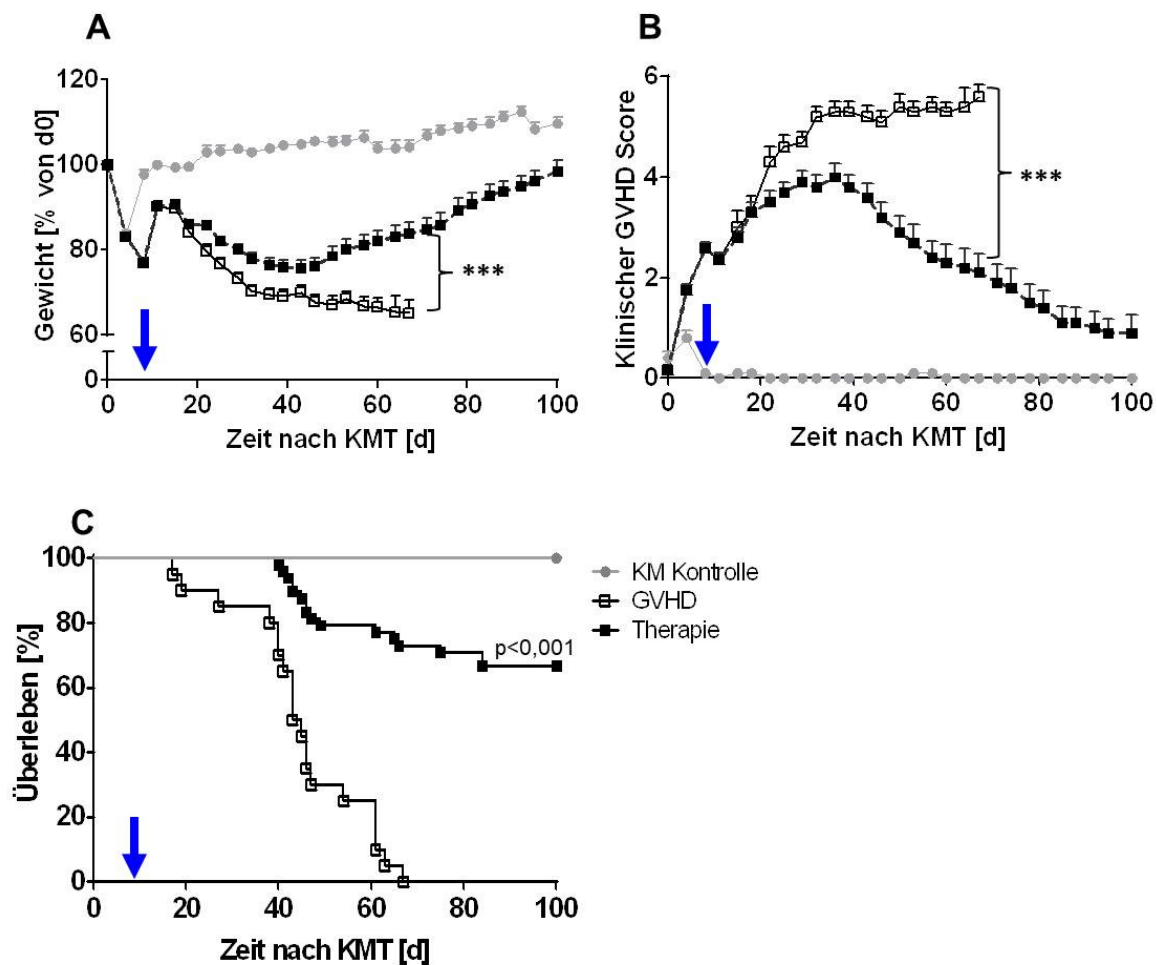


Abb. 4.29: Gewicht, klinischer GVHD Score und Überleben nach haploidenter KMT und Treg-Therapie

CB6F1-Mäuse wurden letal bestrahlt und mit $2,5 \times 10^6$ BALB/c Knochenmark-Zellen alleine (●, KM-Kontrolle, $n=18$) oder zusammen mit $5,0 \times 10^6$ BALB/c Milzzellen (□, GVHD, $n=23$) transplantiert (siehe auch Abb. 4.28). An d11 nach KMT (indiziert durch den blauen Pfeil) wurden einem Teil der GVHD-Tiere zusätzlich $5,0 \times 10^6$ in vitro expandierte BALB/c Treg-Zellen (■, Therapie, $n=48$) injiziert. Die Tiere wurden bis d100 nach KMT engmaschig überwacht, dabei wurde regelmäßig das Gewicht (dargestellt als Prozent des Ausgangsgewichts, A), der klinische GVHD-Score (B) sowie das Überleben (C) der Tiere bestimmt. Kumulative Ergebnisse aus fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten als MW \pm SEM (***) $p < 0,001$.

KM-Kontrolltiere verloren als Folge der Konditionierung initial (d4) nahezu 20% ihres Gewichts ($83,8 \pm 0,64\%$ des Ausgangsgewichts, Abb. 4.29 A) und entwickelten dadurch einen leichten klinischen GVHD-Score ($0,8 \pm 0,15$; Abb. 4.29 B). Beide Parameter normalisierten sich jedoch innerhalb weniger Tage (d11: klinischer GVHD Score 0 ± 0), die Tiere entwickelten auch im weiteren Verlauf keine aGVHD (Abb. 4.29 A, B) und überlebten zu 100% den Beobachtungszeitraum von 100d (Abb. 4.29 C). Rezipienten in denen eine aGVHD induziert worden war verloren hingegen im weiteren Verlauf rasch und stetig an Gewicht (Abb. 4.29 A), bis sie entweder verstarben oder aufgrund der Abbruchkriterien getötet werden mussten. Die fortschreitende Erkrankung schlug sich auch im klinischen GVHD Score nieder (Abb. 4.29 B).

Hier war in GVHD-Tieren eine rasche Zunahme der klinischen Symptomatik bis d32 auf $5,2 \pm 0,21$ zu sehen. Danach stieg der Score nur noch langsam bis zum Erreichen des Maximalwertes an d67 ($5,6 \pm 0,24$). In dieser Plateauphase zwischen d32 und d67 verstarben etwa 70% der GVHD-Tiere (bzw. erreichten die Abbruchkriterien und mussten getötet werden, Abb. 4.29 C). In den ersten Tagen nach der Behandlung der aGVHD mit *in vitro* expandierten Treg des Spenders zeigten die Tiere einen ähnlichen Gewichtsverlauf (Abb. 4.29 A) und GVHD-Score (Abb. 4.29 B) wie unbehandelte GVHD-Tiere. Ab d32 nach KMT war jedoch eine signifikant verbesserte klinische Symptomatik (Therapie: $3,8 \pm 0,25$ versus GVHD: $5,2 \pm 0,21$) und ein geringerer Gewichtsverlust (Therapie: $78,0 \pm 1,31\%$ versus GVHD: $70,3 \pm 2,32\%$) im Vergleich zu unbehandelten GVHD-Tieren zu beobachten. Dies äußerte sich auch in einem Nachlassen der Diarrhöen, der Reversion der Alopezie und einer Verbesserung des Allgemeinzustands der Tiere. Dieser Trend setzte sich im Verlauf fort, bis die Tiere an d100 nach KMT mit $98,5 \pm 2,48\%$ ihres Ausgangsgewichts wieder deutlich an Körpergewicht gewonnen und sich der klinische GVHD-Score auf $0,9 \pm 0,37$ verbessert hatte. Dadurch erhöhte sich auch die Überlebensrate der Tiere signifikant auf 66,67% versus 0% Überleben in der unbehandelten GVHD-Gruppe und die meisten überlebenden Tiere zeigten schlussendlich ein den KM-Kontrolltieren ähnliches Erscheinungsbild.

Um den therapeutische Effekt der Spender-Treg auf die histopathologischen Veränderungen in den typischen GVHD-Zielorganen zu beurteilen, wurden diese anhand etablierter Bewertungsverfahren zu verschiedenen Zeitpunkten nach KMT sowie am Ende des Beobachtungszeitraums von 100d evaluiert (Abb. 4.30).

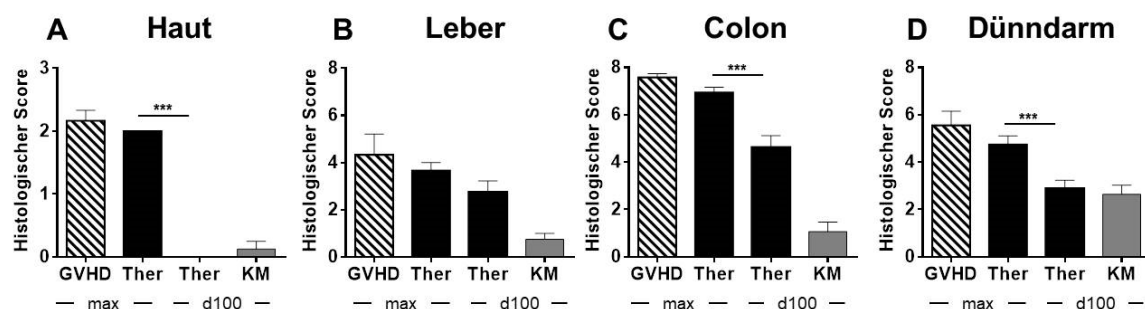


Abb. 4.30: Histopathologische Analyse nach Treg-Therapie in Mäusen mit aGVHD

Letal bestrahlte CB6F1-Rezipienten wurden mit BALB/c KM-Zellen alleine (KM) oder zusätzlichen BALB/c Milzzellen (GVHD) transplantiert. Elf Tage nach KMT wurden einem Teil der Tiere (Ther) *in vitro* expandierte Treg therapeutisch appliziert. Es erfolgte im weiteren Versuchsverlauf zu verschiedenen Zeitpunkten eine histopathologische Beurteilung der GVHD-Zielorgane Haut (A), Leber (B), Colon (C) und Dünndarm (D) nach H/E-Färbung von Paraffinschnitten (durchgeführt von Elisabeth Huber, Institut für Pathologie, UKR). Gezeigt sind MW \pm SEM des maximal (max) erreichten histopathologischen Wertes während des Versuchszeitraums sowie des Wertes am Ende des Beobachtungszeitraums (d100) von je $n=3-13$ Tieren (** $p<0,001$).

Die maximalen histopathologischen Scores entwickelten die therapierten Tiere zwischen d11 und d40 nach KMT. Diese lagen bei $2,00 \pm 0$ in der Haut, bei $3,67 \pm 0,58$ in der Leber, bei $6,94 \pm 0,23$ im Colon und bei $4,75 \pm 0,36$ im Dünndarm und damit jeweils leicht unterhalb der

Maximalwerte in nicht-therapierten GVHD-Tieren (Abb. 4.30). Während sich die pathologische Veränderung in der Haut im weiteren Verlauf bis d100 nach KMT wieder vollständig erholte, wiesen die anderen GVHD-Zielorgane auch am Versuchsende noch histopathologische Veränderungen auf. In der Leber deutete sich mit einem Wert von $2,75 \pm 0,48$ an d100 eine Verbesserung zum Maximalwert an, im Colon ($4,63 \pm 0,47$) und Dünndarm ($2,88 \pm 0,35$) verbesserte sich der histologische Score statistisch signifikant.

In den KM-Kontrolltieren zeigten sich keine langfristigen Schäden der Haut, der Leber und des Colons, jedoch war im Dünndarm über den gesamten Versuchszeitraum hinweg stabil ein geringer histologischer Score von etwa 2 zu sehen, der auf KMT-assoziierte Schäden in diesem Organ hindeutete.

4.3.4 Das Ansprechen auf die Treg-Therapie ist unabhängig vom initialen Schweregrad der aGVHD

Obwohl die Ansprechrate der Tiere auf die Treg-Therapie bei bestehender aGVHD mit 66,67% sehr hoch war, blieb die Frage, worauf das unterschiedliche Ansprechen einzelner Tiere zurückzuführen ist. Um dies näher zu untersuchen, wurden Überleben (Abb. 4.31 A), Gewicht (Abb. 4.31 B) und GVHD-Score (Abb. 4.31 C) der Tiere mit und ohne Therapieerfolg separat betrachtet.

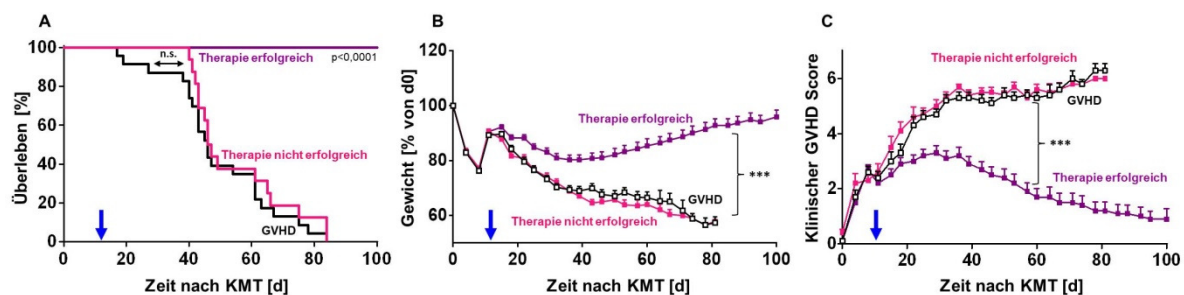


Abb. 4.31: Überleben, Gewicht und klinischer GVHD Score von ‚Respondern‘ vs ‚Non-Respondern‘ der Treg-Therapie

CB6F1-Empfängermäuse wurden nach letaler Bestrahlung mit $2,5 \times 10^6$ BALB/c KM- und $5,0 \times 10^6$ BALB/c Milzzellen (■, GVHD, n=23) transplantiert (siehe auch Abb. 4.28). An d11 nach KMT (indiziert durch den blauen Pfeil) wurden einem Teil der GVHD-Tiere zusätzlich $5,0 \times 10^6$ in vitro expandierten BALB/c Treg-Zellen (Therapie, n=48) appliziert. Retrospektiv wurden die Therapie-Tiere anhand des Therapieerfolges in ‚Responder‘ (■, Therapie erfolgreich, n=32) und ‚Non-Responder‘ (■, Therapie nicht erfolgreich, n=16) unterteilt. Die Tiere wurden bis d100 nach KMT engmaschig überwacht, dabei wurde das Überleben (A), das Gewicht (dargestellt als Prozent des Ausgangsgewichts, B) und der klinische GVHD-Score (C) der Tiere bestimmt. Kumulative Ergebnisse aus fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten als MW \pm SEM ($*** p < 0,001$).

Dabei zeigte sich überraschenderweise, dass Tiere, die trotz Treg-Therapie verstarben, weder einen klinischen Benefit (Gewicht, GVHD-Score) noch einen transienten Überlebensvorteil gegenüber unbehandelten GVHD-Tieren hatten (Abb. 4.31 A). Während die Tiere, die den Beobachtungszeitraum von 100d überlebten, relativ früh auf die Treg-Therapie ansprachen und ihre klinische Symptomatik sowie ihr Körpergewicht ab d22 nach KMT stetig und signifikant verbesserten, zeigte sich in den Tieren ohne Therapieerfolg keinerlei Verbesserung

gegenüber der GVHD-Gruppe. Um auszuschließen, dass die Schwere der aGVHD zum Therapiezeitpunkt für den Erfolg oder Misserfolg der Treg-Therapie verantwortlich war, wurde dies retrospektiv detailliert betrachtet (Abb. 4.32).

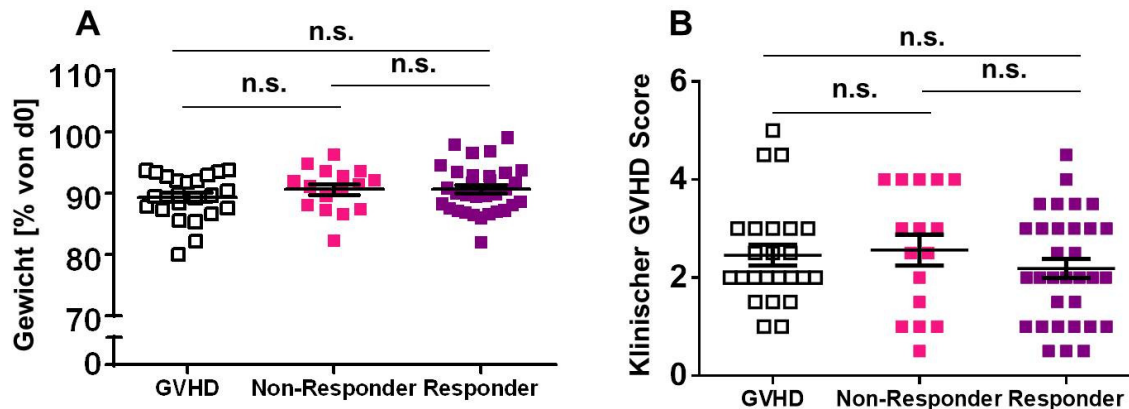


Abb. 4.32: Klinische Symptomatik von 'Respondern' und 'Non-Respondern' der Treg-Therapie an d11 nach KMT

CB6F1-Empfängermäuse wurden nach letaler Bestrahlung mit $2,5 \times 10^6$ BALB/c KM- und $5,0 \times 10^6$ BALB/c Milzzellen (\blacktriangle , GVHD, $n=23$) transplantiert. An d11 nach KMT wurden einem Teil der GVHD-Tiere zusätzlich $5,0 \times 10^6$ in vitro expandierten BALB/c Treg-Zellen (Therapie, $n=48$) appliziert. Retrospektiv wurden die Therapie-Tiere anhand des Therapieerfolges in 'Responder' (\blacksquare , Therapie erfolgreich, $n=32$) und 'Non-Responder' (\bullet , Therapie nicht erfolgreich, $n=16$) unterteilt. Dargestellt sind Gewicht (A) als Prozent des Ausgangsgewichts und der klinische GVHD Score (B) an d11 nach KMT von Tieren aus fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten als MW \pm SEM (n.s. = nicht signifikant).

Die retrospektive Analyse der Parameter Körpergewicht (Abb. 4.32 A) und klinischer GVHD Score (Abb. 4.32 B) zum Zeitpunkt der Therapie (d11 nach KMT) ergaben allerdings keine Hinweise auf signifikante Unterschiede hinsichtlich des Schweregrades der aGVHD zwischen 'Respondern' und 'Non-Respondern'. Insofern erscheint der initiale Schweregrad der aGVHD zum Zeitpunkt der Therapie wohl nicht ausschlaggebend für den Therapieerfolg zu sein und es bleibt zunächst unklar, warum 66,67% der behandelten GVHD-Tiere exzellent auf die Therapie mit *in vitro* expandierten Treg-Zellen ansprechen, während ein Drittel der Tiere nicht profitierte.

4.3.5 Migration, Persistenz und Stabilität therapeutisch applizierter Spender-Treg-Zellen

Bei prophylaktischem Einsatz von Spender-Treg-Zellen in Modellen der allogenen KMT konnte gezeigt werden, dass die applizierten Treg-Zellen vornehmlich in den mesenterialen Lymphknoten und die Milz wandern und dort das sogenannte *Priming* der GVHD-induzierenden konventionellen T-Zellen unterbinden (200, 203). Im Unterschied dazu gelangen die nachträglich applizierten therapeutischen Treg in ein bereits stark inflammatorisch geprägtes Milieu. Um ihr Migrationsverhalten (Abb. 4.33 und Abb. 4.34), aber auch die Stabilität ihres Phänotyps (Abb. 4.36) sowie ihre Persistenz (Abb. 4.33) unter diesen

Bedingungen zu analysieren, wurden Treg-Zellen aus kongenen BALB/c Thy1.1 Mäusen isoliert, *in vitro* expandiert und an d11 nach KMT therapeutisch in GVHD-Mäuse transplantiert. Dies ermöglichte die Unterscheidung therapeutisch applizierter Treg-Zellen (Thy1.1⁺) von mit dem KM bzw. den Spendermilzzellen mittransplantierten bzw. aus Stammzellen rekonstituierten Treg-Zellen (Thy1.1⁻).

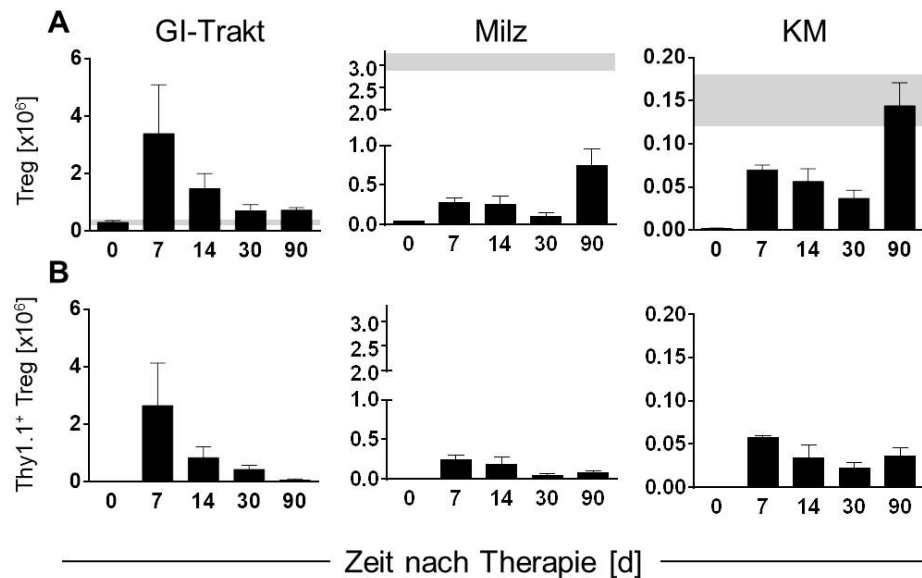


Abb. 4.33: Migration und Persistenz *in vitro* expandierter Treg nach therapeutischer Applikation in CB6F1-Mäuse mit aGVHD

CB6F1-Rezipienten wurden letal bestrahlt und mit BALB/c KM- und Milzzellen transplantiert (siehe Abb. 4.16). An d11 nach KMT wurden die Tiere mit $5,0 \times 10^6$ kongenen (BALB/c Thy1.1), *in vitro* expandierten Spender-Treg-Zellen therapiert. Die indizierten Organe wurden an verschiedenen Tagen nach Therapie entnommen, daraus die Leukozyten isoliert, für TCR β , CD4, Foxp3 und Thy1.1 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. (A) Absolute Zellzahlen aller Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen sowie (B) der kongenen Thy1.1⁺ therapeutischen Treg-Zellen in den indizierten Organen als MW \pm SEM ($n=3-12$ /Gruppe/Organ/Zeitpunkt). Graue Balken indizieren MW \pm SEM von nicht-transplantierten Kontrollen.

Die in der aGVHD verminderte Anzahl an Treg-Zellen in Milz, KM und GI-Trakt wurde durch den adoptiven Transfer von Spender-Treg in allen untersuchten Organen signifikant erhöht (Abb. 4.33 A). So stieg die Treg-Zahl im GI-Trakt von $0,30 \pm 0,07 \times 10^6$ um das ca. 10-fache auf $3,39 \pm 1,70 \times 10^6$ innerhalb von sieben Tagen nach Treg-Therapie. In Absolutzahlen konnten aus dem GI-Trakt die meisten Treg-Zellen reisoliert werden. In der Milz stieg die Treg-Zahl um das ca. 5-fache von $0,05 \pm 0,01 \times 10^6$ auf $0,28 \pm 0,06 \times 10^6$ an Tag 7 nach Therapie; der relativ gesehen stärkste Anstieg fand im KM statt, wo die Treg-Zahl um das fast 30-fache von $2,4 \pm 0,23 \times 10^3$ auf $70,0 \pm 5,8 \times 10^3$ zunahm. Die Gesamtzahl an Treg-Zellen im GI-Trakt therapierter Rezipienten sank im weiteren Verlauf bis auf $0,73 \pm 0,09 \times 10^6$ an d90 nach Therapie (etwa d100 nach KMT) und befand sich damit wieder im Bereich der Werte nicht-transplantierte Kontrolltiere ($0,30 \pm 0,11 \times 10^6$). In der Milz hingegen sank die Gesamtzahl an Treg-Zellen leicht an d30 nach Therapie auf $0,10 \pm 0,05 \times 10^6$ und stieg danach bis d90 signifikant auf $0,75 \pm 0,21 \times 10^6$ an, blieb damit aber unter den Werten nicht-transplantierte Kontrolltiere ($3,28 \pm 0,40 \times 10^6$). Im KM war ebenfalls eine leichte Reduktion der Treg-Zellen

bis d30 nach Therapie auf $40,0 \pm 9,0 \times 10^3$ zu beobachten. Hier stieg die Gesamtzahl an d90 jedoch signifikant auf $144,0 \pm 27,0 \times 10^3$ an und lag damit im Bereich der Werte nicht-transplantierte CB6F1-Tiere ($150,0 \pm 30,0 \times 10^3$).

Die deutlich erhöhte Treg-Anzahl an d7 nach Therapie beruhte größtenteils auf den therapeutisch applizierten, Thy1.1⁺ Treg-Zellen bzw. deren Nachkommen (Abb. 4.33 B). So fanden sich im GI-Trakt an d7 nach Therapie durchschnittlich $2,66 \pm 1,48 \times 10^6$, in der Milz $0,24 \pm 0,06 \times 10^6$ und im KM $60,0 \pm 2,0 \times 10^3$ therapeutisch applizierte Thy1.1⁺ Treg, die damit 67% der lokalen Treg-Population im GI-Trakt und jeweils 86% der Treg-Population in Milz und KM stellten. Ihr Anteil sank danach in allen Organen wieder ab, allerdings konnten die Treg bzw. ihre Nachkommen bis d90 nach Therapie noch in allen untersuchten Organen nachgewiesen werden.

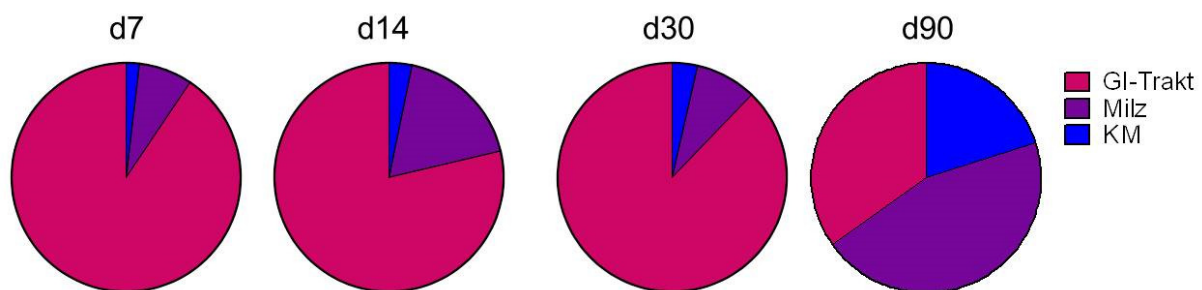


Abb. 4.34: Organverteilung der therapeutisch applizierten Treg

Prozentuale Verteilung der in Abb. 4.33 gezeigten therapeutischen Treg zwischen dem GI-Trakt, der Milz und dem KM von Rezipienten nach haploidenter KMT und Treg-Therapie an d11 (n=3-12).

Betrachtet man die Verteilung der therapeutisch verabreichten Thy 1.1⁺ Treg in den einzelnen Organen zu verschiedenen Zeitpunkten, so wird deutlich, dass bis d30 nach Therapie mit 78-90% der prozentual größte Anteil in den GI-Trakt einwanderte (Abb. 4.34). Während der Anteil im KM stabil bei 2-3% blieb, fand zwischen d7 und d14 nach Therapie eine vermehrte Migration bzw. Proliferation in der Milz statt, sodass sich der Anteil der therapeutischen Treg von 7,56% auf 18,06% erhöhte. An d90 nach Therapie ergab sich ein etwas anderes Bild mit einer fast gleichmäßigen Verteilung der verbliebenen therapeutisch applizierten Treg zwischen allen drei Organen mit im Schnitt 34,85% im GI-Trakt, 45,10% in der Milz und 20,05% im KM.

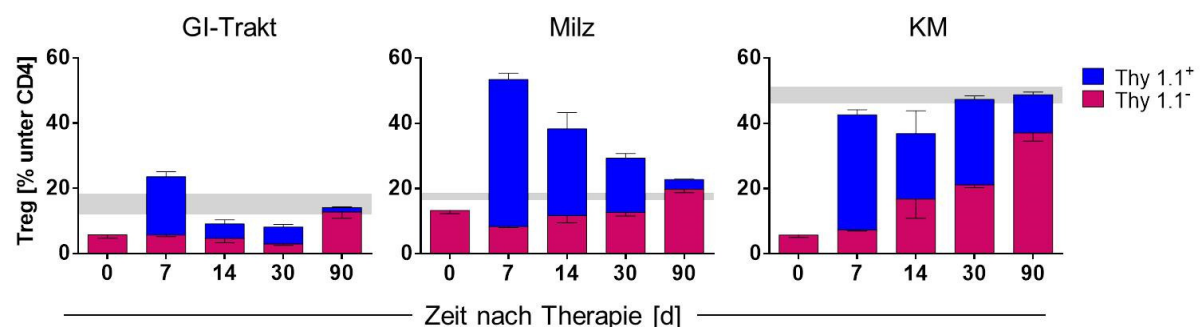


Abb. 4.35: Treg-Frequenz unter CD4⁺ T-Zellen nach haploidenter KMT und Treg-Therapie

CB6F1-Rezipienten wurden letal bestrahlt und mit BALB/c KM- und Milzzellen transplantiert (siehe Abb. 4.16). An d11 nach KMT wurden die Tiere mit $5,0 \times 10^6$ kongenen (BALB/c Thy1.1), in vitro expandierten

Spender-Treg-Zellen therapiert. Die indizierten Organe wurden an verschiedenen Tagen nach Therapie entnommen, die Leukozyten daraus isoliert, gegen TCR β , CD4, Foxp3 und Thy1.1 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt sind MW \pm SEM der Foxp3⁺ Zellen unter Donor CD4⁺ T-Zellen, unterteilt in therapeutisch applizierte Thy 1.1⁺ Treg und kotransplantierte oder rekonstituierte Thy 1.1⁺ Treg (n=3-12). Graue Balken indizieren MW \pm SEM von nicht-transplantierten Kontrollen.

Die an d11 nach KMT (d0 der Therapie) in GI-Trakt, Milz und KM sehr niedrige Treg-Frequenz konnte durch die therapeutische Gabe *in vitro* expandierter Spender-Treg in allen Organen innerhalb von 7d deutlich gesteigert werden: Im GI-Trakt von $5,80 \pm 1,06\%$ auf $23,64 \pm 1,98\%$, in der Milz von $13,33 \pm 0,99\%$ auf $53,47 \pm 2,25\%$ und im KM von $5,77 \pm 0,77\%$ auf $42,63 \pm 1,89\%$. Dies führte im GI-Trakt und dem KM dazu, dass Werte nicht-transplanterter Kontrolltiere erreicht wurden (graue Balken), während diese in der Milz sogar weit übertroffen wurden. Wie in Abb. 4.33 und Abb. 4.34 gezeigt, migrierte innerhalb von 7d nach adoptivem Transfer prozentual und absolut gesehen der größte Anteil therapeutischer Thy1.1⁺ Treg in den GI-Trakt. Betrachtet man jedoch ihren prozentualen Anteil unter den CD4⁺Foxp3⁺ T-Zellen in den untersuchten Organen (Abb. 4.35), so stellten sie 7d nach Applikation in allen Organen etwa 75-90% der Treg-Population (GI-Trakt: $75,88 \pm 5,78\%$ Milz: $84,31 \pm 3,92\%$ KM: $82,82 \pm 5,42\%$). Während sich im GI-Trakt und der Milz die Treg-Frequenz im weiteren Verlauf auf das Niveau nicht-transplanterter Kontrolltiere reduzierte, erreichte die Treg-Frequenz im KM erst an d90 nach Therapie Normalwerte. In allen Organen verringerte sich der Anteil therapeutischer Treg über den Beobachtungszeitraum, einhergehend mit der Rekonstitution bzw. Expansion von Treg aus dem Transplantat. Im KM war 3 Monate nach der Therapie mit $23,99 \pm 4,54\%$ noch der höchste Anteil an therapeutischen Treg-Zellen zu finden, während im GI-Trakt und in der Milz mit $9,44 \pm 5,26\%$ bzw. $12,83 \pm 2,67\%$ eine etwas geringere Persistenz zu beobachten war.

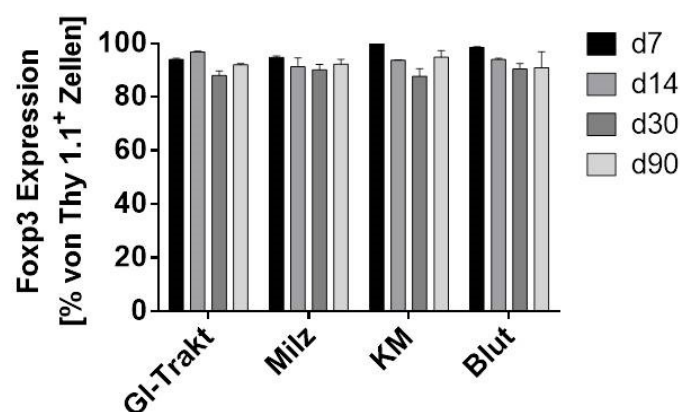


Abb. 4.36: Stabilität therapeutischer Treg in KMT-Rezipienten mit aGVHD

*CB6F1-Rezipienten wurden letal bestrahlt und mit BALB/c KM- und Milzzellen transplantiert (siehe Abb. 4.16). An d11 nach KMT wurden die Tiere mit $5,0 \times 10^6$ kongenen (BALB/c Thy1.1), *in vitro* expandierten Spender-Treg-Zellen therapiert. Die indizierten Organe wurden an verschiedenen Tagen nach Therapie entnommen, die Leukozyten daraus isoliert, gegen TCR β , CD4, Foxp3 und Thy1.1 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt sind MW \pm SEM der Foxp3-Expression von CD4⁺Thy1.1⁺ Zellen (n=3-10).*

Die phänotypische und funktionelle Stabilität regulatorischer T-Zellen in einer stark inflammatorischen Umgebung wurde verschiedentlich in Frage gestellt. Aus diesem Grund analysierten wir die Foxp3-Expression der therapeutisch verabreichten (Thy1.1⁺) Treg-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transfer. Wie in Abb. 4.36 zu sehen, zeigten alle Nachkommen der therapeutischen Treg-Zellen in den untersuchten Organen und über den gesamten Beobachtungszeitraum von 90d einen stabilen Foxp3⁺ Phänotyp, was für ihre phänotypische und funktionelle Stabilität auch unter den stark inflammatorischen Bedingungen einer aGVHD spricht.

Therapeutisch applizierte *in vitro* expandierte Spender-Treg-Zellen erhöhten also die initial niedrige Treg-Frequenz in lymphoiden und gastrointestinalen Geweben und migrierten präferentiell in den Darm, dem wichtigsten Zielorgan der aGVHD. Therapeutische Treg konnten bis zu drei Monate nach einmaliger Applikation nachgewiesen werden und exprimierten stabil Foxp3.

4.3.6 Verbesserte hämatopoietische Rekonstitution nach Treg-Therapie

Die für die KMT essentielle Konditionierung dient der Zerstörung residueller Tumorzellen, eradiziert die Empfängerhämatopoese und ermöglicht das Anwachsen der hämatopoetischen Stammzellen des Spenders. Entwickelt sich im Folgenden eine aGVHD, so kommt es durch die systemische Inflammation zu einer verzögerten und teilweise dysregulierten Immunrekonstitution, die vor allem die Lymphopoese betrifft (224-226). Dies geht einher mit strukturellen Schädigungen der primären und sekundären Lymphorgane wie Knochenmark und Thymus sowie Milz und Lymphknoten. Um zu untersuchen, ob die Treg-Therapie die GVHD-assoziierten Störungen der Immunrekonstitution beeinflusst, wurde im Folgenden die Zusammensetzung des Leukozytenkompartiments in KM und Milz zu verschiedenen Zeitpunkten nach Treg-Gabe analysiert.

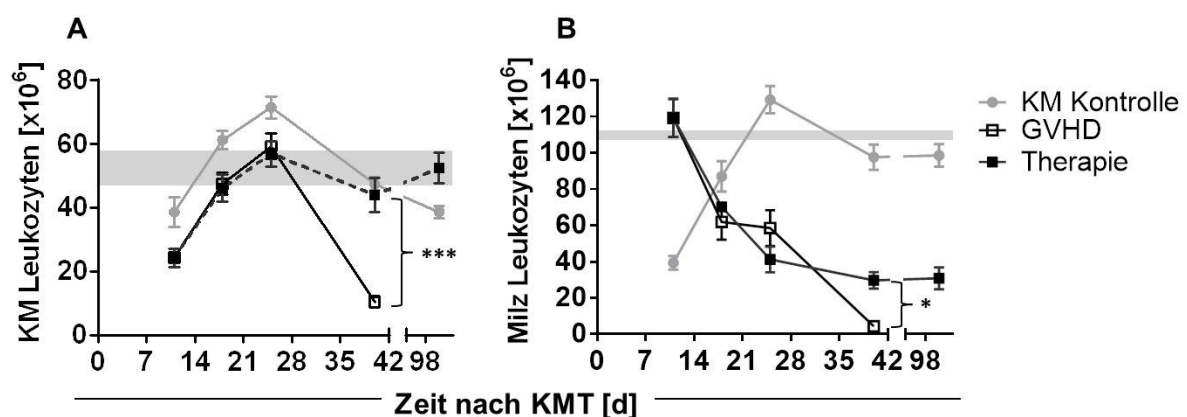


Abb. 4.37: Leukozytengehalt von KM und Milz nach haploidenter KMT und Treg-Therapie
 CB6F1-Rezipienten wurden letal bestrahlt und mit BALB/c KM- und Milzzellen transplantiert (siehe Abb. 4.16). An d11 nach KMT erhielt ein Teil der Tiere mit aGVHD zusätzlich $5,0 \times 10^6$ *in vitro* expandierte BALB/c Treg-Zellen als Therapie. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde jeweils ein Teil der Tiere getötet, das KM (aus 2 Hinterläufen, A) und die Milz entnommen und nach Herstellung von

Einzelzellsuspensionen mittels Türks-Zählung die Anzahl lebender Leukozyten in KM (A) und Milz (B) ermittelt. Dargestellt sind MW \pm SEM von KM-Kontroll- (●, je n=9-25 Tiere/Zeitpunkt), GVHD- (□, je n=10-17 Tiere/Zeitpunkt) und Therapie-Tieren (■, je n=11-20 Tiere/Zeitpunkt). Graue Balken indizieren MW \pm SEM von nicht-transplantierten CB6F1-Kontrollmäusen (* p<0,05; *** p<0,001).

Die an d11 nach KMT noch relativ geringe Leukozytenzahl im Knochenmark (Abb. 4.37 A) von KM-Kontrolltieren mit $38,61 \pm 4,66 \times 10^6$ erhöhte sich bis d25 auf $71,55 \pm 3,47 \times 10^6$ und sank danach bis d100 mit $38,79 \pm 1,93 \times 10^6$ wieder etwas unter das Level nicht-transplanterter CB6F1 Mäuse ab ($52,34 \pm 5,55 \times 10^6$). Die überschießende KM-Regeneration bis d25 war auch in nicht-therapierten GVHD-Tieren zu beobachten, mit initial $24,33 \pm 2,92 \times 10^6$ und maximal $59,38 \pm 3,93 \times 10^6$ KM-Leukozyten. Danach kam es jedoch zu einem drastischen Rückgang, sodass die Zellularität bis d40 auf $10,46 \pm 1,90 \times 10^6$ und damit auf etwa 20% der normalen Zellzahl absank. Wurden GVHD-Tiere an d11 nach KMT mit *in vitro* expandierten Treg therapiert, so zeigten sie anfänglich (bis d25) einen ähnlichen Verlauf wie nicht behandelte GVHD-Tiere. Die KM-Insuffizienz in den darauffolgenden Tagen konnte durch die Treg-Therapie jedoch fast vollständig verhindert werden und in der Folge erreichten die Tiere bis d100 mit $52,50 \pm 4,72 \times 10^6$ Leukozyten wieder einen normalen Zellgehalt im KM.

Auch in der Milz (siehe Abb. 4.37 B) lag an d11 nach KMT die Leukozytenzahl der KM-Kontrolltiere mit $39,40 \pm 3,72 \times 10^6$ deutlich niedriger als in nicht-transplantierten Kontrolltieren ($109,67 \pm 2,73 \times 10^6$). Danach stieg sie jedoch stetig bis d25 auf $129,23 \pm 7,52 \times 10^6$ an und blieb auch im weiteren Verlauf annähernd auf Normalniveau. Im Gegensatz dazu zeigten GVHD-Tiere, vor allem in Folge der ausgeprägten Lymphoproliferation an d11 nach KMT mit $119,17 \pm 10,48 \times 10^6$ eine deutlich höhere Zellzahl. Diese verringerte sich im weiteren Verlauf jedoch stetig, bis an d40 nach KMT nur noch $4,42 \pm 2,52 \times 10^6$ Leukozyten aus der Milz isoliert werden konnten. Ähnlich wie im KM zeigten Tiere nach Treg-Therapie auch in der Milz initial keine wesentliche Veränderung gegenüber nicht-therapierten GVHD-Tieren. Allerdings konnte die komplette Fibrosierung der Milz bis d40 nach KMT unterbunden werden, so dass sich die Zellzahl im weiteren Verlauf bis d100 bei $30,83 \pm 5,99 \times 10^6$ Zellen/Milz einpendelte.

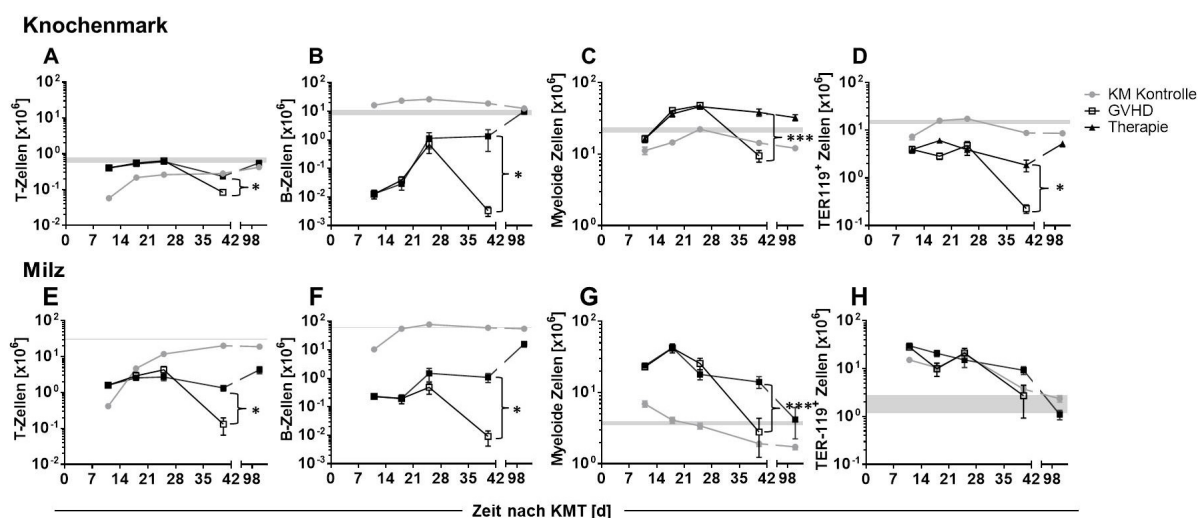


Abb. 4.38: Zelluläre Zusammensetzung der Leukozyten aus KM und Milz nach haploidenter KMT und Treg-Therapie

Die in Abb. 4.37 gezeigten Leukozyten aus KM (A-D) und Milz (E-H) von CB6F1-Rezipienten wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach haploidenter KMT auf TCR β (A,E), CD19 (B, F), CD11b (C, G) und TER-119 (D, H) gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt sind MW \pm SEM der KM-Kontrolltiere (\bullet , KM-Kontrolle, je n=9-25), GVHD-Tiere (\square , GVHD, je n=10-17) und Therapie-Tiere (\blacksquare , Therapie, je n=11-20). Graue Balken indizieren MW \pm SEM von nicht-transplantierten CB6F1-Mäusen. Statistik: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Bei näherer Betrachtung zeigten KM-Kontrolltiere für alle untersuchten Leukozytensubpopulationen (T- und B-Zellen sowie myeloide Zellen) eine rasche Rekonstitution in KM und Milz und in beiden Organen regenerierten sich alle Zellreihen innerhalb von vier bis sechs Wochen nach KMT auf das Niveau nicht-transplantierte Tiere (Abb. 4.38). Ebenso normalisierte sich die Erythropoese, die als Folge der Konditionierung in den ersten drei Wochen nach KMT vor allem extramedullär in der Milz angesiedelt war (normale Anzahl an Ter-119⁺ Vorläuferzellen in KM und Milz von KM-Kontrolltieren an d100, Abb. 4.38 D und H).

Im Vergleich dazu enthielten das KM und die Milz von GVHD-Tieren an d11 nach KMT signifikant mehr T-Zellen ($0,41 \pm 0,05 \times 10^6$ versus $0,06 \pm 0,01 \times 10^6$ im KM und $1,61 \pm 0,14 \times 10^6$ versus $0,42 \pm 0,04 \times 10^6$ in der Milz), während der B-Zellgehalt signifikant reduziert war ($0,01 \pm 0,004 \times 10^6$ versus $16,37 \pm 2,26 \times 10^6$ im KM und $0,23 \pm 0,02 \times 10^6$ versus $10,42 \pm 1,17 \times 10^6$ in der Milz). Gleichzeitig konnte eine stark erhöhte Anzahl myeloider Zellen (Monozyten, Granulozyten) in der Milz von GVHD-Tieren nachgewiesen werden, die bis zur Kontraktionsphase an d40 nach KMT relativ konstant blieb. Im Rahmen dieser Kontraktionsphase kam es zu einem beinahe 90%-igen Rückgang der T- und B-Zellzahlen in beiden Organen, der durch die therapeutische Gabe *in vitro* expandierter Treg an d11 weitestgehend verhindert werden konnte. Dies war besonders eindrücklich bei den B-Zellen zu beobachten (Abb. 4.38 B und F) und führte im Verlauf zur Normalisierung der B-Zellzahlen im KM, während die B-Zellzahl in der Milz auch an d100 mit $1,09 \pm 0,38 \times 10^6$ noch vermindert war im Vergleich zu KM-Kontrolltieren ($55,52 \pm 5,24 \times 10^6$) oder nicht-transplantierten CB6F1-Mäusen ($61,45 \pm 3,18 \times 10^6$). Die im Rahmen der aGVHD auftretende Fibrosierung der Milz scheint also durch die Treg-Therapie nicht vollständig reversibel zu sein.

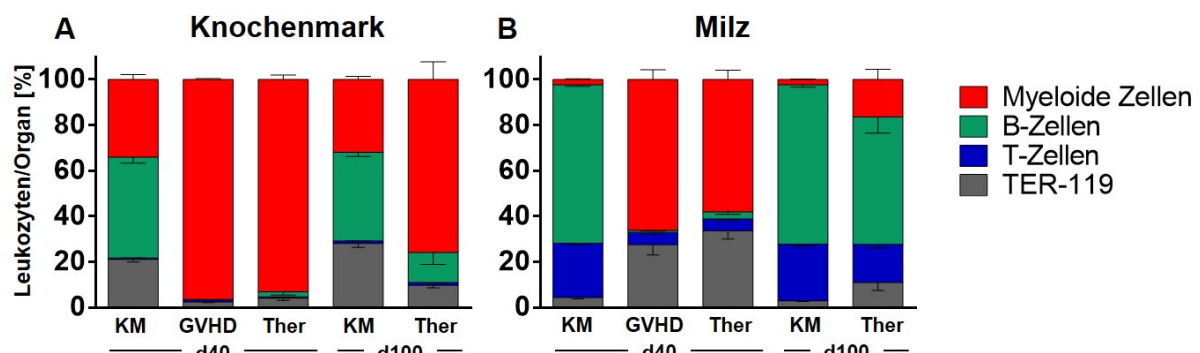


Abb. 4.39: Prozentuale Zusammensetzung der Leukozyten aus KM und Milz nach haploidenter KMT und Treg-Therapie

Die in Abb. 4.37 gezeigten Leukozyten aus Knochenmark (A) und Milz (B) von CB6F1-Rezipienten wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach haploidenter KMT (d40, 100) gegen TCR β (T-Zellen), CD19 (B-Zellen), CD11b (myeloide Zellen) und TER-119 (erythrozytäre Vorläufer) gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt sind MW \pm SEM der prozentualen Anteile der einzelnen Subpopulationen in KM-Kontrolltieren (KM, je n=12-25), GVHD-Tieren (GVHD, je n=10) und Therapie-Tieren (Ther, je n=16-17).

Die Betrachtung der prozentualen Zusammensetzung der Leukozytenpopulationen an d40 nach KMT verdeutlicht das Ausmaß der GVHD-induzierten Dysregulation der Immunrekonstitution in KM (Abb. 4.39 A) und Milz (Abb. 4.39 B). Während sich in GVHD-Tieren ein Großteil der erythrozytären Vorläuferzellen in der Milz befand und hier über 20% der Zellen stellte, war der Anteil an T- und vor allem B-Lymphozyten mit 0-5% wesentlich geringer als in KM-Kontrolltieren zu diesem Zeitpunkt ($0,92 \pm 0,07\%$ bzw. $5,39 \pm 0,73\%$ T-Zellen und $0,05 \pm 0,009\%$ bzw. $0,83 \pm 0,27\%$ B-Zellen in KM und Milz). Dafür war der Anteil myeloider Zellen mit 96% im KM und 66% in der Milz von GVHD-Tieren drastisch erhöht (gegenüber 34% im KM und 2% in der Milz von KM-Kontrolltieren).

In Tieren, in denen die andernfalls letal verlaufende aGVHD erfolgreich durch die Gabe von *in vitro* expandierten Spender-Treg-Zellen therapiert werden konnte, regenerierte und normalisierte sich die Leukozytenpopulation bis d100 nach KMT deutlich. So waren die erythrozytären Vorläufer wieder vermehrt im KM zu finden ($9,75 \pm 1,08\%$) und näherten sich damit dem Gehalt in KM-Kontrolltieren ($28,12 \pm 1,78\%$) an. Der T-Zellgehalt normalisierte sich ebenfalls ($1,16 \pm 0,23\%$ versus $1,15 \pm 0,05\%$ in Therapie- und KM-Kontrolltieren) und es war eine B-Zellrekonstitution zu erkennen ($13,22 \pm 5,26\%$ versus $38,78 \pm 1,76\%$). Allerdings blieb weiterhin eine Verschiebung zu einem höheren prozentualen Anteil an myeloiden Zellen ($75,89 \pm 7,67\%$ versus $31,95 \pm 1,37\%$) bestehen. In der Milz ergab sich ein ähnliches Bild: Erythrozytäre Vorläufer nahmen in den therapierten GVHD-Tieren prozentual gesehen ab, lagen jedoch mit $10,97 \pm 3,50\%$ immer noch über dem Anteil von $2,95 \pm 0,32\%$ in KM-Kontrolltieren. Der T- und B-Zellgehalt erreichte mit $16,70 \pm 1,59\%$ bzw. $55,90\% \pm 7,03$ ähnliche Werte wie in den KM-Kontrolltieren ($24,88 \pm 0,85\%$ bzw. $69,85 \pm 1,02\%$). Jedoch war auch in der Milz an d100 nach KMT mit $16,43 \pm 4,47\%$ immer noch ein leicht erhöhter Prozentsatz an myeloiden Zellen im Vergleich zu KM-Kontrolltieren ($2,31 \pm 0,14\%$) vorhanden. Um die Ursachen der GVHD-induzierten Lymphopenie, die vor allem das B-Zellkompartiment betraf, näher zu untersuchen, wurde das Knochenmark von Tieren mit und ohne aGVHD nach haploidenter KMT sowie nach Treg-Therapie hinsichtlich des Gehalts an pluripotenten Stammzellen (LSK-Zellen) sowie an daraus entstehenden lymphozytären Vorläuferzellen (CLP 1: T-, B- und NK-Zell-restringiert und CLP 2: ausschließlich B-Zell-restringiert) untersucht (siehe Abb. 4.40).

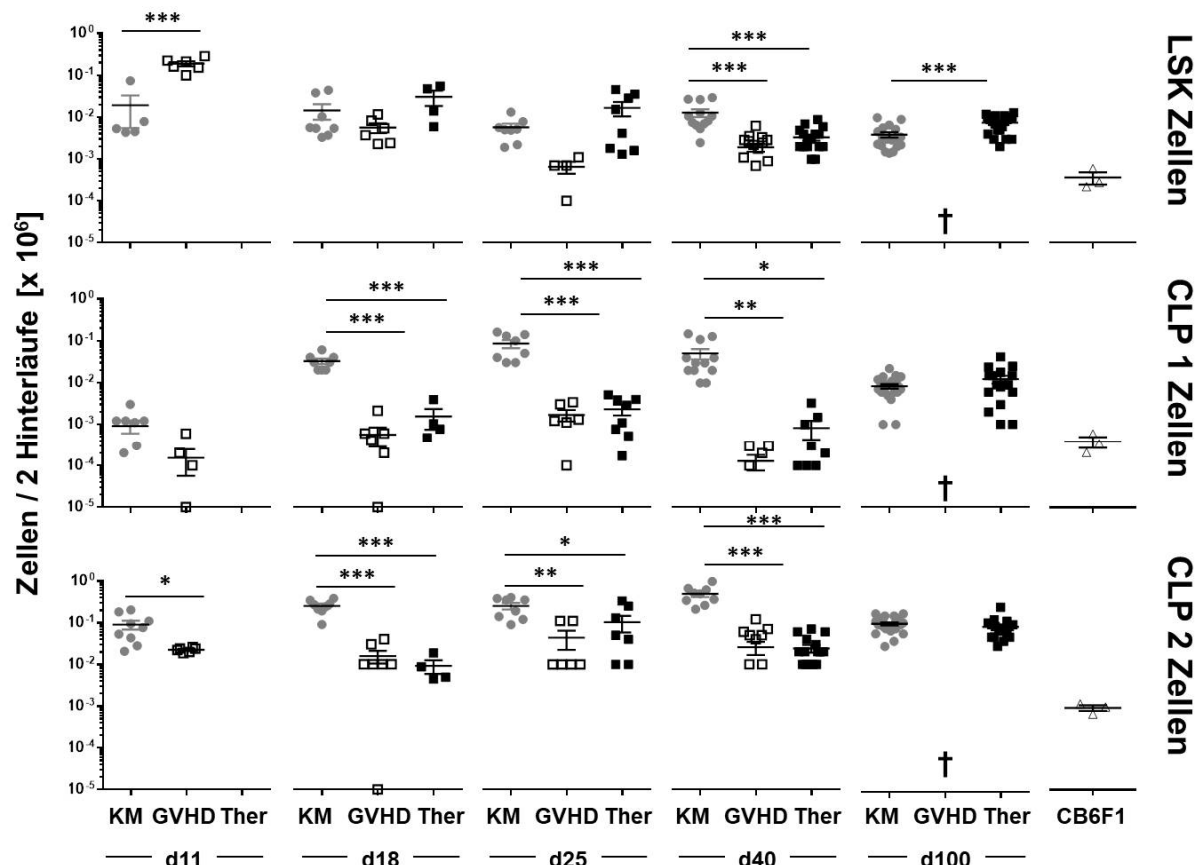


Abb. 4.40: Leukozytäre Vorläufer im KM nach Treg-Therapie

Nach letaler Bestrahlung erhielten die Rezipienten $2,5 \times 10^6$ Knochenmark-Zellen (BALB/c) alleine (●, KM, je $n=9-24$), oder zusammen mit $5,0 \times 10^6$ BALB/c Milzzellen (□, GVHD, je $n=6-16$). An d11 nach KMT wurden einem Teil der GVHD-Tiere zusätzlich $5,0 \times 10^6$ in vitro expandierte BALB/c Treg-Zellen (■, Ther, je $n=4-17$) injiziert. Unbehandelte CB6F1 sind als Kontrolle gezeigt (Δ, $n=3$). Absolute Zellzahlen von LSK- (oben), CLP1- (Mitte) und CLP2-Zellen (unten) im KM von CB6F1-Rezipienten an den angegebenen Zeitpunkten nach haploidenter KMT. Jeweils MW \pm SEM (* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$).

Das KM von KM-Kontrolltieren enthielt über den gesamten Beobachtungszeitraum (d11 bis d100 nach KMT) eine ca. 10-30-fach erhöhte Anzahl an LSK-Zellen, mit $8,5 \pm 1,90 \times 10^4$ eine bis zu 300-fach höhere Anzahl an CLP1 (d25) und mit $49,00 \pm 7,86 \times 10^4$ einen maximal 500-fach erhöhten Gehalt an CLP2 (d40), was auf eine protrahierte Rekonstitution der Myelo- und Lymphopoese nach KMT schließen lässt.

Interessanterweise zeigten unbehandelte GVHD-Tiere an d11 nach KMT eine noch deutlichere Erhöhung des LSK-Gehalts, der mit $18,98 \pm 2,64 \times 10^4$ sogar signifikant höher lag als in KM-Kontrolltieren. Bereits zu diesem Zeitpunkt lagen die CLP1- und CLP2-Zahlen jedoch deutlich niedriger als in den transplantierten Tieren ohne aGVHD und im weiteren Verlauf sank der LSK-Gehalt um beinahe 95%, während sich die CLP1- und CLP2-Zellzahlen auf den anfänglich niedrigen Werten stabilisierten. GVHD-Tiere, die an d11 nach KMT mit regulatorischen T-Zellen therapiert worden waren, zeigten für alle drei Populationen bis d40 nach KMT einen ähnlichen Verlauf wie unbehandelte GVHD-Tiere, lediglich die in unbehandelten GVHD-Tieren beobachtete rasch absinkende Anzahl an LSK-Zellen blieb in

den therapierten Tieren bis d25 nach KMT auf einem höheren Niveau. An d40 sanken schließlich ähnlich wie in unbehandelten GVHD-Tieren alle Zellpopulationen signifikant unter das Niveau der KM-Kontrolltiere, an d100 fand sich in erfolgreich therapierten Tieren dann aber eine ähnliche Anzahl an CLP1- und CLP2-Vorläuferzellen wie in KM-Kontrolltieren und sogar eine leicht erhöhte Anzahl an LSK-Zellen, was für eine langfristige Normalisierung der lymphohämatopoetischen Regeneration in diesen Tieren spricht.

In Abb. 4.37 wurde gezeigt, dass die Behandlung mit regulatorischen T-Zellen die hämatopoietische Rekonstitution in GVHD-Tieren förderte und die GVHD-induzierte B-Zelldepletion revidierte (Abb. 4.38). Um diesen Vorgang näher zu charakterisieren, wurden an d100 nach KMT die Verteilung der einzelnen B-Zell-Entwicklungsstufen im KM (Abb. 4.41) sowie die B-Zell-Subpopulationen in der Milz (Abb. 4.42) analysiert.

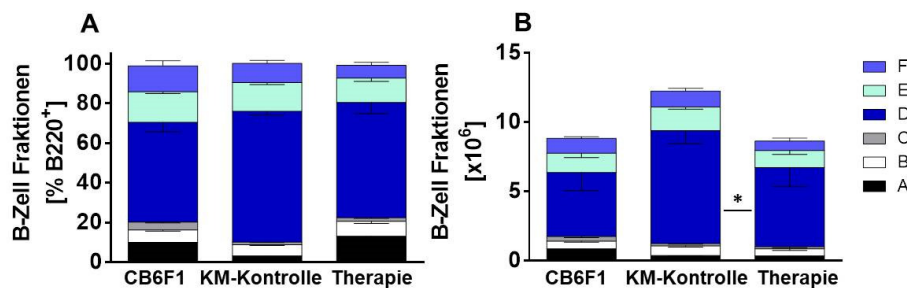


Abb. 4.41: B-Zell-Fraktionen im KM an d100 nach KMT

Prozentuale Anteile (A) und absolute Zellzahlen (B) der B-Zell-Populationen (Einteilung der B-Zellen in Fraktion A-F erfolgte nach Hardy (227)) im KM von CB6F1-Rezipienten nach haploidenter KMT mit $2,5 \times 10^6$ BALB/c KM-Zellen alleine (KM-Kontrolle, $n=9$) bzw. zusätzlich mit $5,0 \times 10^6$ BALB/c Milzzellen und Injektion von $5,0 \times 10^6$ in vitro expandierten BALB/c Treg-Zellen an d11 (Therapie, $n=10$). An d100 nach KMT wurden Leukozyten aus den beiden Hinterläufen der Tiere isoliert, mit Antikörpern für B220, CD43, IgD, IgM, BP-1 und CD24 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Als Referenz dienten nicht-transplantierte CB6F1-Mäuse (CB6F1, $n=3$). Gezeigt sind MW \pm SEM (* $p<0,05$).

Die Einteilung der verschiedenen Stufen der B-Zellentwicklung im KM nach Hardy (227) unterscheidet die früheste Vorstufe der Prä-Pro-B-Zelle (Fraktion A), die Pro-B-Zelle (Fraktion B) und die große Prä-B-Zelle (Fraktion C) sowie die kleine Prä-B-Zelle (Fraktion D), die zur unreifen B-Zelle (Fraktion E) wird und das KM auf dieser Entwicklungsstufe verlässt. Die Fraktion F beinhaltet schließlich rezirkulierende, reife B-Zellen.

Während in KM-Kontrolltieren Zellen der Fraktion A sowohl prozentual als auch in absoluten Zellzahlen etwas niedriger waren als in nicht-transplantierten Tieren, waren B-Zellen der Fraktion D zumindest in absoluten Zellzahlen erhöht. Da die Tiere zu diesem Zeitpunkt im KM einen immer noch leicht erhöhten B-Zellgehalt aufwiesen (siehe auch Abb. 4.38), ist diese Verschiebung am ehesten auf die anhaltende B-Zell-Rekonstitution nach KMT zurückzuführen. In Treg-therapierten Tieren waren, ähnlich wie in KM-Kontrolltieren, Zellen der Fraktion A in absoluten Zellzahlen gegenüber nicht-transplantierten Tieren leicht reduziert, die Zellzahl der Fraktion D hingegen signifikant geringer als in KM-Kontrolltieren. Insgesamt ließen sich in den therapierten Tieren aber sämtliche Entwicklungsstufen der B-Zell-Reihe

nachweisen, was eine erfolgreiche Regeneration der B-Lymphopoese nach Treg-Therapie bestätigte.

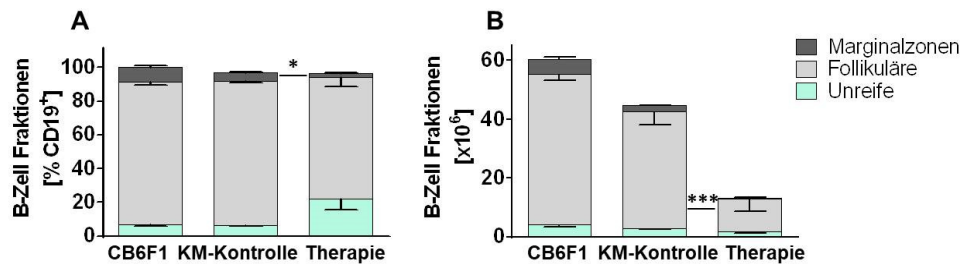


Abb. 4.42: B-Zell-Fraktionen in der Milz an d100 nach KMT

Prozentuale Anteile (A) und absolute Zellzahlen (B) der B-Zell-Populationen in der Milz von CB6F1-Rezipienten nach haploidenter KMT mit $2,5 \times 10^6$ BALB/c KM-Zellen alleine (KM-Kontrollgruppe, KM, $n=5$) bzw. mit $5,0 \times 10^6$ BALB/c Milzzellen und Treg-Therapie an d11 nach KMT mit $5,0 \times 10^6$ in vitro expandierten BALB/c Treg-Zellen (Therapie, $n=7$). An d100 nach KMT wurden Leukozyten aus der Milz der Tiere isoliert, mit Antikörpern für CD19, CD21 und CD23 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Als Referenz dienten nicht-transplantierte CB6F1-Mäuse (CB6F1, $n=3$). Gezeigt sind MW \pm SEM (* $p<0,05$, *** $p<0,001$).

In nicht-transplantierten CB6F1-Mäusen bestand der B-Zell-Pool in der Milz aus 85% follikulären, 9% Marginalzonen- und etwa 6% transitionellen, unreifen B-Zellen (Abb. 4.42 A). In KM-Kontrolltieren an d100 nach KMT war die prozentuale Verteilung dieser B-Zell-Differenzierungsstufen sehr ähnlich, lediglich der Anteil an Marginalzonen-B-Zellen war leicht reduziert. Die in absoluten Zellzahlen etwas niedrigere Gesamt-B-Zellzahl beruhte vor allem auf einer verringerten Anzahl an follikulären B-Zellen. Die Zellularität der Milz von Treg-behandelten GVHD-Tieren an d100 war deutlich vermindert (siehe vor allem Abb. 4.37 B). Dies betraf die follikulären B-Zellen, die gegenüber KM-Kontrolltieren signifikant reduziert waren, aber auch Marginalzonen-B-Zellen, die als T-Zell-unabhängige Gedächtnis-B-Zellen vor allem die Immunabwehr gegen bakterielle Antigene vermitteln. Insgesamt waren jedoch prozentual alle B-Zellsubpopulationen in der Milz vertreten, so dass zumindest von einer partiellen Rekonstitution der Milzfunktion auszugehen ist. Im Unterschied zum KM, dessen Zellularität sich in Treg-therapierten Tieren weitgehend normalisierte, schienen die GVHD-induzierten Gewebeschäden der Milz also nur partiell reversibel.

Zusammenfassend zeigten diese Untersuchungen, dass die aGVHD die Hämatopoese im KM beeinträchtigte und die Lymphopoese sowohl auf der Ebene der Vorläuferzellen im KM schädigte als auch peripher in den lymphatischen Organen. Das empfindlichste Kompartiment diesbezüglich war die B-Lymphopoese, die in GVHD-Tieren komplett zusammenbrach. Nach Therapie mit *in vitro* expandierten Treg des Spenders konnten diese Effekte gestoppt werden, die KM-Funktion normalisierte sich, so dass auch die Lymphopoese im KM wieder in Gang kam. Die GVHD-induzierte Fibrosierung der Milz scheint hingegen nicht komplett reversibel zu sein, weshalb ihre Zellularität auch langfristig vermindert blieb.

4.3.7 Therapeutische Treg unterstützen die Regeneration des Gastrointestinaltraktes und dämpfen die Inflammation im Colon

Die GVHD-induzierte Zerstörung von Dün- und Dickdarm ist hauptsächlich für die hohe Morbidität und Mortalität der GVHD verantwortlich. Deshalb wurde der Einfluss der Treg-Therapie auf die GVHD-induzierten Veränderungen des Darmes im Detail untersucht. Hierzu werden zunächst die Veränderungen im Dünndarm (siehe Abb. 4.43 bis Abb. 4.46) und danach die Auswirkungen der Behandlung auf das Colon (Abb. 4.47 bis Abb. 4.55) gezeigt.

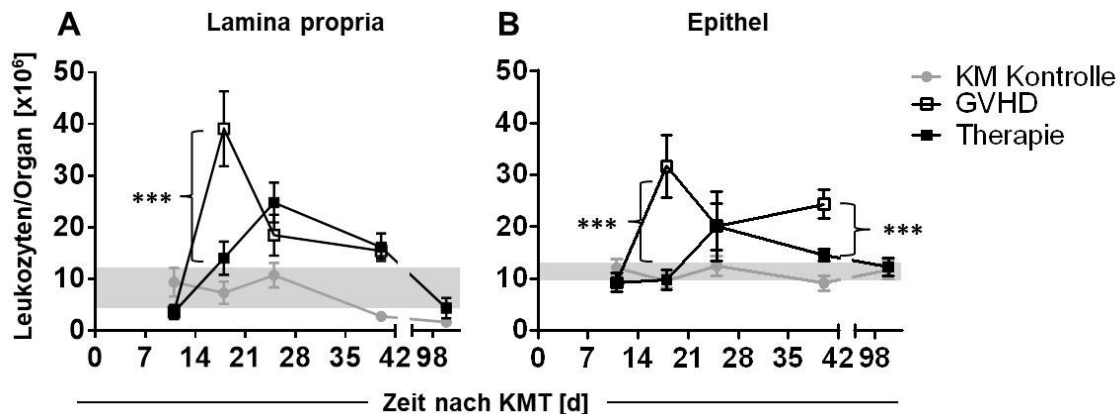


Abb. 4.43: Leukozytengehalt von Lamina propria und Epithel des Dünndarms nach haploidenter KMT und Treg-Therapie

Anzahl der Leukozyten in der Lamina propria (A) und im Epithel (B) des Dünndarms von CB6F1 Rezipienten nach haploidenter KMT. Nach letaler Bestrahlung erhielten die Rezipienten $2,5 \times 10^6$ BALB/c KM-Zellen alleine (●, KM Kontrolle, je $n=12-24$) oder zusammen mit $5,0 \times 10^6$ BALB/c Milzzellen (□, GVHD, je $n=10-17$). Ein Teil der GVHD-Tiere erhielt an d11 nach KMT zusätzlich $5,0 \times 10^6$ in vitro expandierte BALB/c Treg-Zellen (■, Therapie, je $n=10-20$). Zu verschiedenen Zeitpunkten nach KMT wurden Tiere aus den einzelnen Gruppen getötet und die Leukozyten in den einzelnen Kompartimenten des Dünndarms quantifiziert (je MW \pm SEM; *** $p < 0,001$).

Die haploidente KMT hatte keinen signifikanten Einfluß auf den Leukozytengehalt der Lamina propria (Abb. 4.43 A) und des Epithels (Abb. 4.43 B) im Dünndarm, da KM-Kontrolltiere im gesamten Untersuchungszeitraum ähnliche Zellzahlen aufwiesen wie nicht-transplantierte CB6F1-Mäuse (durchschnittlich $6,41 \pm 1,79 \times 10^6$ Leukozyten in der LP und $11,02 \pm 0,69 \times 10^6$ Leukozyten im Epithel). Im Unterschied hierzu kam es in GVHD-Tieren an d18 nach KMT zu einem deutlichen Influx von Leukozyten sowohl in die LP ($39,12 \pm 7,25 \times 10^6$) als auch in das Epithel ($28,54 \pm 6,23 \times 10^6$) des Dünndarms, der sich im Verlauf der nächsten 7 Tage um ca 50% reduzierte. Während der Leukozytengehalt in der LP bis d40 nach KMT etwa auf demselben Level blieb, stieg dieser im Epithel noch einmal deutlich auf $24,34 \pm 2,84 \times 10^6$ an. Erhielten die GVHD-Tiere an d11 nach KMT zusätzlich Spender-Treg-Zellen, so kam es zu einem wesentlich geringeren Anstieg der Leukozytenzahlen in beiden Kompartimenten, die mit $24,83 \pm 3,87 \times 10^6$ in der LP und $17,95 \pm 3,57 \times 10^6$ im Epithel erst an d25 nach KMT Maximalwerte erreichten. Im weiteren Verlauf reduzierte sich der Leukozytengehalt in beiden Kompartimenten bis dieser an d100 nach KMT im Normbereich nicht-transplanterter Kontrolltiere lag.

Um die Zusammensetzung des Leukozyteninfiltrats zu charakterisieren, wurden die Leukozytenpopulationen in LP und Epithel des Dünndarms durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 4.44).

Das Leukozyteninfiltrat in LP (Abb. 4.44 A) und Epithel (Abb. 4.44 B) von GVHD-Tieren an d18 nach KMT bestand ausschließlich aus $\alpha\beta$ -T-Zellen und myeloischen Zellen, wobei letztere in der LP wesentlich prominenter vertreten waren als im Epithel. Durch die Treg-Therapie wurde der starke Anstieg von $\alpha\beta$ -T-Zellen in LP und Epithel an d18 sowie die Zunahme der myeloiden Zellen in der LP fast vollständig unterbunden und es kam lediglich im Epithel zu einer transienten Anreicherung von $\alpha\beta$ -T-Zellen, die an d40 bereits wieder deutlich rückläufig war. Darüber hinaus regenerierten sich in den Therapie-Tieren (im Unterschied zu unbehandelten GVHD-Tieren) die $\gamma\delta$ -T-Zellen und erreichten bereits an d40 ein den KM-Kontrolltieren angeglichenes Niveau, das bis d100 erhalten blieb. Die Anzahl an $\alpha\beta$ -T-Zellen blieb bis d100 nach KMT mit $10,38 \pm 3,12 \times 10^6$ leicht erhöht im Vergleich zu KM-Kontrolltieren ($6,51 \pm 2,22 \times 10^6$), ebenso die Anzahl an myeloiden Zellen ($0,89 \pm 0,22 \times 10^6$ versus $0,20 \pm 0,06 \times 10^6$ in KM-Kontrolltieren).

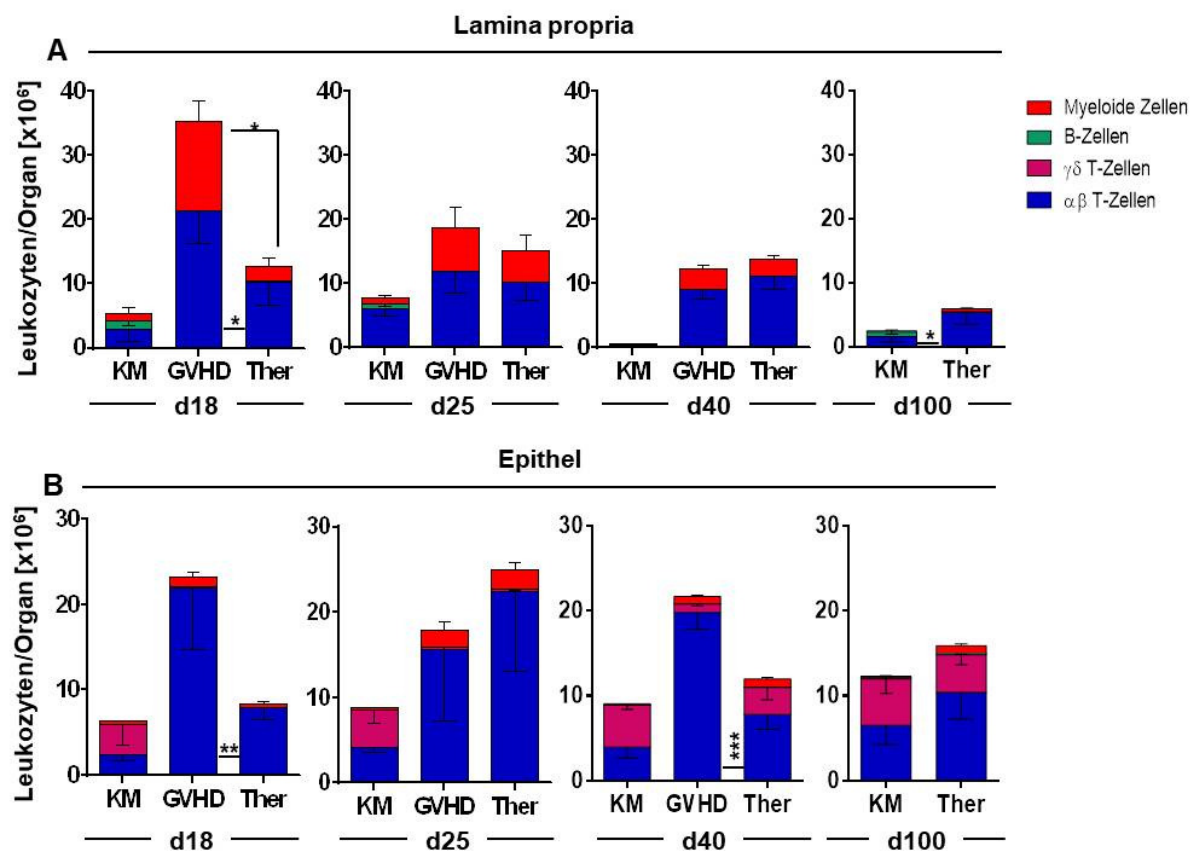


Abb. 4.44: Analyse der Leukozytenpopulationen von Lamina propria und Epithel des Dünndarms nach haploidenter KMT und Treg-Therapie

CB6F1-Empfängermäuse wurden letal bestrahlt und mit $2,5 \times 10^6$ BALB/c KM-Zellen alleine (KM, je $n=3-10$ Zellpools/Zeitpunkt aus je 3-6 Tieren) oder zusammen mit $5,0 \times 10^6$ BALB/c Milzzellen (GVHD,

*n=3-8 Zellpools/Zeitpunkt aus je 3-6 Tieren) transplantiert. Ein Teil der GVHD-Tiere erhielt an d11 nach KMT zusätzlich $5,0 \times 10^6$ in vitro expandierte BALB/c Treg-Zellen (Ther, *n=3-8 Zellpools/ Zeitpunkt aus je 3-6 Tieren*). Zu verschiedenen Zeitpunkten nach KMT wurden Tiere aus den einzelnen Gruppen getötet, die im Dünndarm der Tiere enthaltenen Leukozyten mit Antikörpern für CD11b (myeloide Zellen), CD19 (B-Zellen), TCR $\gamma\delta$ ($\gamma\delta$ -T-Zellen) und TCR β ($\alpha\beta$ -T-Zellen) gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Dargestellt sind MW \pm SEM der absoluten Anzahl der jeweiligen Leukozytenpopulationen in der LP (A) und im Epithel (B) des Dünndarms (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$).*

Um die Wirkung der therapeutischen Treg-Zellen auf die GVHD-induzierte Inflammation zu analysieren, erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten nach KMT die Isolierung von mRNA aus dem Dünndarm zur Bestimmung von Zytokin- und Chemokinspiegeln mittels qRT-PCR. Da sich die Werte an d18 und d25 nicht nennenswert von denen an d40 nach KMT unterschieden, werden im Folgenden nur die Werte von d40 und d100 nach KMT (Abb. 4.45) gezeigt.

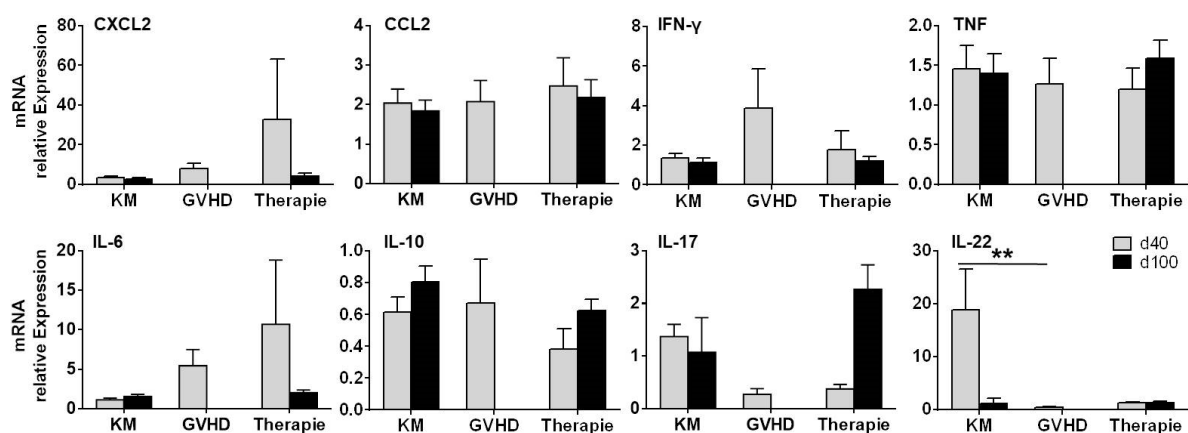


Abb. 4.45: mRNA-Spiegel verschiedener Chemokine und Zytokine des Dünndarms an d40 und d100 nach haploidenter KMT

*CB6F1-Mäuse wurden letal bestrahlt, mit BALB/c KM-Zellen alleine (KM, *n=6-9*) oder zusätzlich mit Milzzellen (GVHD, *n=12*) transplantiert und ein Teil der GVHD-Tiere an d11 nach KMT mit in vitro expandierten BALB/c Treg-Zellen therapiert (Therapie, *n=3-11*). An d40 und d100 nach KMT wurde der Dünndarm entnommen und wie in Abschnitt 3.2.9.1 beschrieben für die mRNA-Isolierung aufgearbeitet. Die Analyse der Expression der gezeigten Chemokine und Zytokine erfolgte nach Umschreiben der mRNA in cDNA mittels qRT-PCR. HPRT diente als ‚housekeeping‘-Gen. Dargestellt ist das Expressionsniveau im Vergleich zu nicht-transplantierten Tieren (arbiträr auf 1 gesetzt) als MW \pm SEM (** $p<0,01$).*

Interessanterweise kam es in unbehandelten GVHD-Tieren im Vergleich zu d11 nach KMT (siehe Abb. 4.25) zu keinem weiteren Anstieg der Zytokin- und Chemokinexpression und damit – zumindest auf Grundlage dieser Daten – zu keiner Verstärkung des proinflammatorischen Milieus im Dünndarm. In Treg-therapierten GVHD-Tieren war an d40 nach KMT ein transienter Anstieg der CXCL2- und IL-6-Spiegel zu beobachten, die bis d100 wieder auf ein normales Niveau absanken. KM-Kontrolltiere zeigten an d40 nach KMT einen starken, jedoch ebenfalls nur transienten Anstieg der IL-22-Expression im Vergleich zu d11 ($18,90 \pm 7,67$ -fach), der auf aktive Geweberegenerationsprozesse hinweisen könnte. Alle anderen untersuchten Zytokine und Chemokine verhielten sich unauffällig.

Paneth-Zellen (PZ) sezernieren antimikrobielle Peptide und Defensine und spielen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des Mikrobioms. In einer Reihe von Studien (171-

173) wurde eine Korrelation zwischen PZ-Verlust und Schweregrad der gastrointestinalen aGVHD nachgewiesen. Wie bereits in Abb. 4.26 gezeigt, geht auch in dem hier untersuchten haploidenten KMT-Modell die GVHD mit einem PZ-Verlust einher, gepaart mit einer signifikanten Reduktion der Reg3 γ -Expression. Um zu untersuchen, ob dieser Verlust durch eine Treg-Therapie revidiert werden kann, wurde die Entwicklung beider Parameter seriell untersucht (Abb. 4.46).

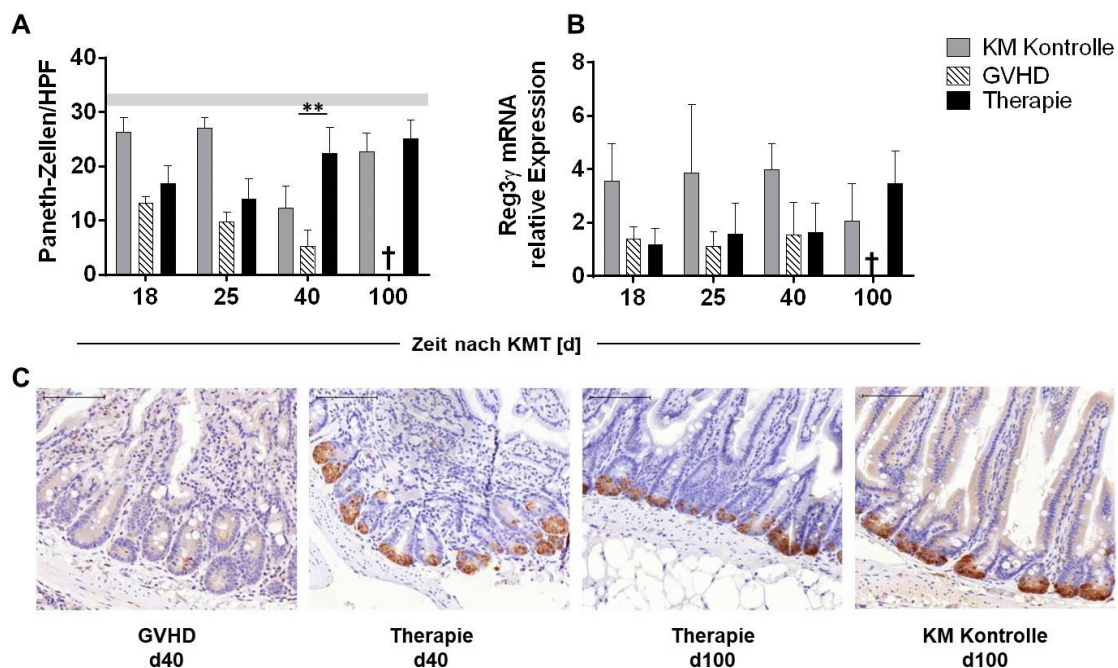


Abb. 4.46: Kinetik der Paneth-Zellen und Reg3 γ -Spiegel im Dünndarm nach haploidenter KMT und Treg-Therapie

CB6F1-Rezipienten wurden letal bestrahlt und mit $2,5 \times 10^6$ KM-Zellen alleine (KM-Kontrolle) oder mit zusätzlich $5,0 \times 10^6$ Milzzellen ohne (GVHD) oder mit Treg-Therapie ($5,0 \times 10^6$ Spender-Treg-Zellen) an d11 nach KMT (Therapie) transplantiert. Die histologische (A und C) und molekularbiologische Analyse des Dünndarms erfolgte an den angezeigten Zeitpunkten nach KMT. (A) Quantifizierung der Paneth-Zellen (durchgeführt von Elisabeth Huber, Institut für Pathologie, UKR) aus H/E-gefärbten Präparaten als MW \pm SEM ($n=5-15$). Der graue Balken indiziert MW \pm SEM in nicht-transplantierten CB6F1-Mäusen als Referenz. (B) Reg3 γ -mRNA-Expression (qRT-PCR mit HPRT als 'housekeeping'-Gen; normalisiert auf die Expressionsspiegel in nicht-transplantierten CB6F1-Tieren arbiträr auf 1 gesetzt) als MW \pm SEM ($n=6-13$). (C) Immunhistologische Färbung auf Lysozym (braun) nach Einbettung in Paraffin (20x Vergrößerung). Statistik: ** $p < 0,01$.

KM-Kontrolltiere zeigten bis auf einen transienten Einbruch an d40 nach KMT eine konstant hohe Anzahl von Paneth-Zellen im Dünndarm, die mit durchschnittlich $22,09 \pm 3,40$ PZ/HPF nur leicht unterhalb der PZ-Anzahl nicht-transplantierte CB6F1-Mäuse lag (Abb. 4.46 A). Im Unterschied hierzu kam es in GVHD-Tieren zu einem PZ-Verlust ($2,9 \pm 0,99$ PZ/HPF an d11) (siehe Abb. 4.26) mit transients Regeneration an d18 ($13,19 \pm 1,26$ PZ/HPF), danach sank der PZ-Gehalt bis d40 nach KMT wieder auf $5,28 \pm 3,04$ PZ/HPF ab. Therapie-Tiere zeigten initial eine ähnliche Regeneration der Paneth-Zellen wie nicht-therapierte GVHD-Tiere (Abb. 4.46 A), allerdings war diese nicht nur transient, sondern erreichte mit $22,42 \pm 4,78$ PZ/HPF an d40 ein signifikant höheres Niveau als in GVHD-Tieren und die PZ-Zahlen blieben bis zum Versuchsende an d100 mit $25,06 \pm 3,48$ PZ/HPF stabil. Über die immunhistologische Färbung

auf das antimikrobiell wirksame Enzym Lysozym konnte dieser Befund sowie die Funktionalität der Paneth-Zellen bestätigt werden (Abb. 4.46 C).

Paneth-Zellen, aber auch andere intestinale epitheliale Zellen sezernieren das antimikrobielle Lektin Reg3 γ . KM-Kontrolltiere zeigten, ähnlich wie an d11 (siehe Abb. 4.26 B) auch noch an d18 nach KMT eine gegenüber nicht-transplantierten Tieren um $3,54 \pm 0,58$ -fach erhöhte Reg3 γ -Expression im Dünndarm, die über den gesamten Versuchsverlauf auf diesem hohen Niveau erhalten blieb und erst bis d100 wieder leicht auf $2,05 \pm 0,40$ -fach absank. Im Vergleich dazu stieg die Reg3 γ -Expression in GVHD-Tieren nach der an d11 nach KMT deutlich reduzierten Expression von $0,56 \pm 0,08$ -fach auf maximal $1,54 \pm 0,36$ -fach an d40 an. Therapierte GVHD-Tiere zeigten initial einen ähnlichen Verlauf, allerdings konnte an d100 nach KMT eine $3,48 \pm 0,34$ -fach erhöhte Expression des antimikrobiellen Peptids im Vergleich zu nicht-transplantierten Kontrolltieren nachgewiesen werden, was auf eine gegenüber KM-Kontrolltieren (ähnliche Reg3 γ -Level bereits an d11 und d18) verzögerte Regeneration des Dünndarmepithels hinweisen könnte. Zusammenfassend wurde im haploidenten GVHD-Modell eine starke Infiltration von hauptsächlich Donor- $\alpha\beta$ -T-Zellen in die LP und das Epithel des Dünndarms beobachtet, die zu Gewebeschäden und zum Verlust der Paneth-Zellen führte mit verminderter Expression des antimikrobiellen Peptids Reg3 γ . Die Treg-Therapie verhinderte die massiven T-Zellinfiltrationen und beförderte so langfristig die Regeneration der Dünndarmschleimhaut sowie des mukosa-assoziierten leukozytären /lymphatischen Systems (MALT).

Neben den pathologischen Veränderungen im Dünndarm zeigten sich histologisch insbesondere im Colon von unbehandelten GVHD-Tieren schwere Gewebeschäden (s. Score in Abb. 4.30). Beobachtet wurde hier unter anderem ein Verlust der Integrität der mukosalen Krypten, lymphozytäre Infiltrate in der Lamina Propria, Kryptenzellapoptosen sowie Ulzerationen der Mukosa.

Um die zellulären Infiltrate zu charakterisieren und den Einfluss der Treg-Therapie zu analysieren, wurden analog der Dünndarmanalysen auch Leukozyten aus LP und Epithel des Colons zu festgelegten Zeitpunkten isoliert, quantifiziert (siehe Abb. 4.43) und durchflusszytometrisch untersucht (siehe Abb. 4.48 bis Abb. 4.50).

Ähnlich wie im Dünndarm hatten Konditionierung und KMT auch im Colon keinen signifikanten Einfluss auf den Leukozytengehalt von Lamina propria (Abb. 4.47 A) und Epithel (Abb. 4.47 B) und die Leukozytenzahlen in diesen Kompartimenten lagen im gesamten Untersuchungszeitraum mit durchschnittlich $1,27 \pm 0,26 \times 10^6$ in der LP und $0,53 \pm 0,11 \times 10^6$ im Epithel im Bereichs nicht-transplantierte CB6F1-Mäuse. Als Folge der GVHD-Induktion kam es (wie in Abb. 4.20 bereits gezeigt) zu einem drastischen Leukozyteninflux in die LP und

das Epithel des Colons an d11, der in der LP bis d40 auf maximal $5,69 \pm 0,56 \times 10^6$ Zellen weiter anstieg. Im Epithel nahm die Anzahl der Leukozyten dagegen rasch wieder ab und lag an d40 nur noch bei $0,91 \pm 0,09 \times 10^6$ Zellen. Durch die Therapie mit *in vitro* expandierten Spender-Treg an d11 konnte der Leukozyteninflux in die LP bis d40 signifikant unterdrückt werden ($3,82 \pm 0,53 \times 10^6$), im Epithel bewirkte sie bereits an d18 eine deutliche Reduktion der infiltrierenden Leukozyten. Im weiteren Verlauf normalisierte sich die Zellzahl in beiden Kompartimenten und lag an d100 nach KMT mit $1,93 \pm 0,72 \times 10^6$ in der LP und $0,60 \pm 0,16 \times 10^6$ im Epithel im Bereich der KM-Kontrolltiere ($1,92 \pm 0,30 \times 10^6$ bzw. $0,40 \pm 0,06 \times 10^6$). Zur Liniendifferenzierung der Infiltrate wurden diese wieder durchflusszytometrisch untersucht (Abb. 4.48).

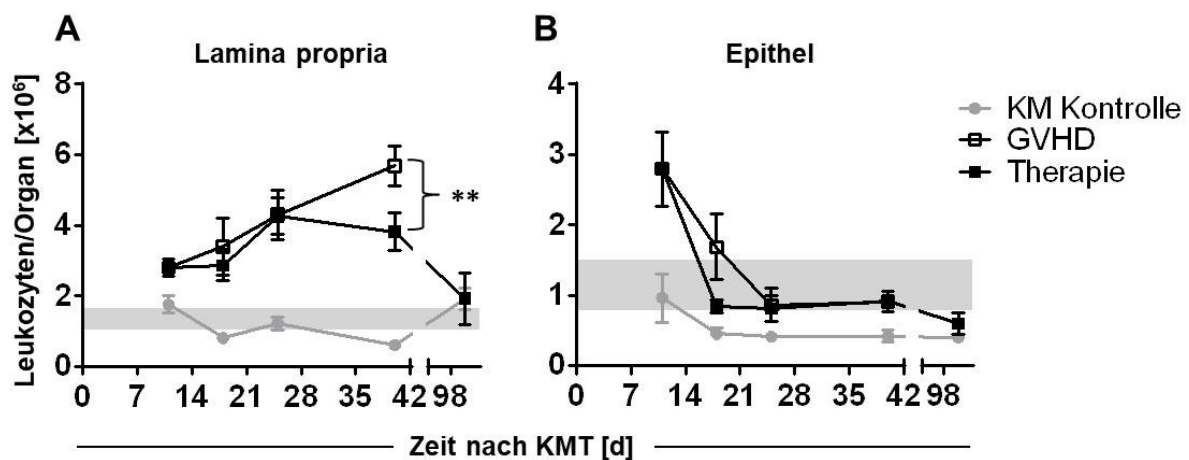


Abb. 4.47: Leukozytengehalt von Lamina propria und Epithel des Colons nach haploidenter KMT und Treg-Therapie

Anzahl der Leukozyten in der Lamina propria (A) und im Epithel (B) des Colons von CB6F1 Rezipienten nach haploidenter KMT. Nach letaler Bestrahlung erhielten die Rezipienten $2,5 \times 10^6$ BALB/c KM-Zellen alleine (●, KM Kontrolle, je n=12-24) oder zusammen mit $5,0 \times 10^6$ BALB/c Milzzellen (□, GVHD, je n=10-17). Ein Teil der GVHD-Tiere erhielt an d11 nach KMT zusätzlich $5,0 \times 10^6$ *in vitro* expandierte BALB/c Treg-Zellen (■, Therapie, je n=10-20). Zu verschiedenen Zeitpunkten nach KMT wurden Tiere aus den einzelnen Gruppen getötet und die Leukozyten in den einzelnen Kompartimenten des Colons quantifiziert (je MW \pm SEM; ** $p < 0,01$).

Wie bereits in Abb. 4.21 gezeigt führte die Konditionierung zu einem Verlust von B-Zellen in der LP des Colons (Abb. 4.48 A), der sich erst an d100 nach KMT wieder normalisierte. Darüber hinaus zeigten KM-Kontrolltiere in der LP keine wesentlichen Veränderungen. Im Unterschied hierzu war in GVHD-Tieren ein massiv erhöhtes Leukozyteninfiltrat in der LP des Colons (Abb. 4.48 A) zu beobachten, das fast ausschließlich aus $\alpha\beta$ -T-Zellen und myeloiden Zellen bestand, während B-Zellen zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen werden konnten. Die Zellzusammensetzung der LP in Treg-therapierten Tieren ähnelte initial der von GVHD-Tieren, an d40 zeigte sich dann allerdings eine deutliche Reduktion der $\alpha\beta$ -T-Zellen ($0,30 \pm 0,10 \times 10^6$ versus $1,15 \pm 0,17 \times 10^6$). Bis d100 kam es in erfolgreich therapierten Tieren zur weitgehenden Normalisierung der Zellzusammensetzung in der LPL und es kam wie in KM-Kontrolltieren zu einer Rekonstitution des intestinalen B-Zell-Pools.

Die Subgruppenanalyse der intraepithelialen Leukozyten des Colons (Abb. 4.48 B) gestaltete sich aufgrund der sehr geringen Zellzahlen nach d11 außerordentlich schwierig. Ähnlich wie im Dünndarmepithel war aber der komplette Verlust der $\gamma\delta$ -T-Zellen bei aGVHD auffällig. In Treg-behandelten Tieren erholten sich die $\gamma\delta$ -T-Zellen an d40 und waren auch an d100 nachweisbar, wenn auch in leicht verminderter Anzahl ($0,16 \pm 0,03 \times 10^6$) gegenüber KM-Kontrolltieren ($0,31 \pm 0,08 \times 10^6$). Der starke Influx von $\alpha\beta$ -T-Zellen in das Epithel, der bereits an d11 nach KMT detektierbar war (siehe Abb. 4.21), wurde durch die therapeutische Applikation von Treg-Zellen bereits 7 Tage später deutlich inhibiert. Diese Suppression hielt bis d40 nach KMT an, sodass in Therapie-Tieren nur noch $0,26 \pm 0,06 \times 10^6$ $\alpha\beta$ -T-Zellen im Vergleich zu $0,54 \pm 0,07 \times 10^6$ $\alpha\beta$ -T-Zellen in GVHD-Tieren nachgewiesen werden konnten.

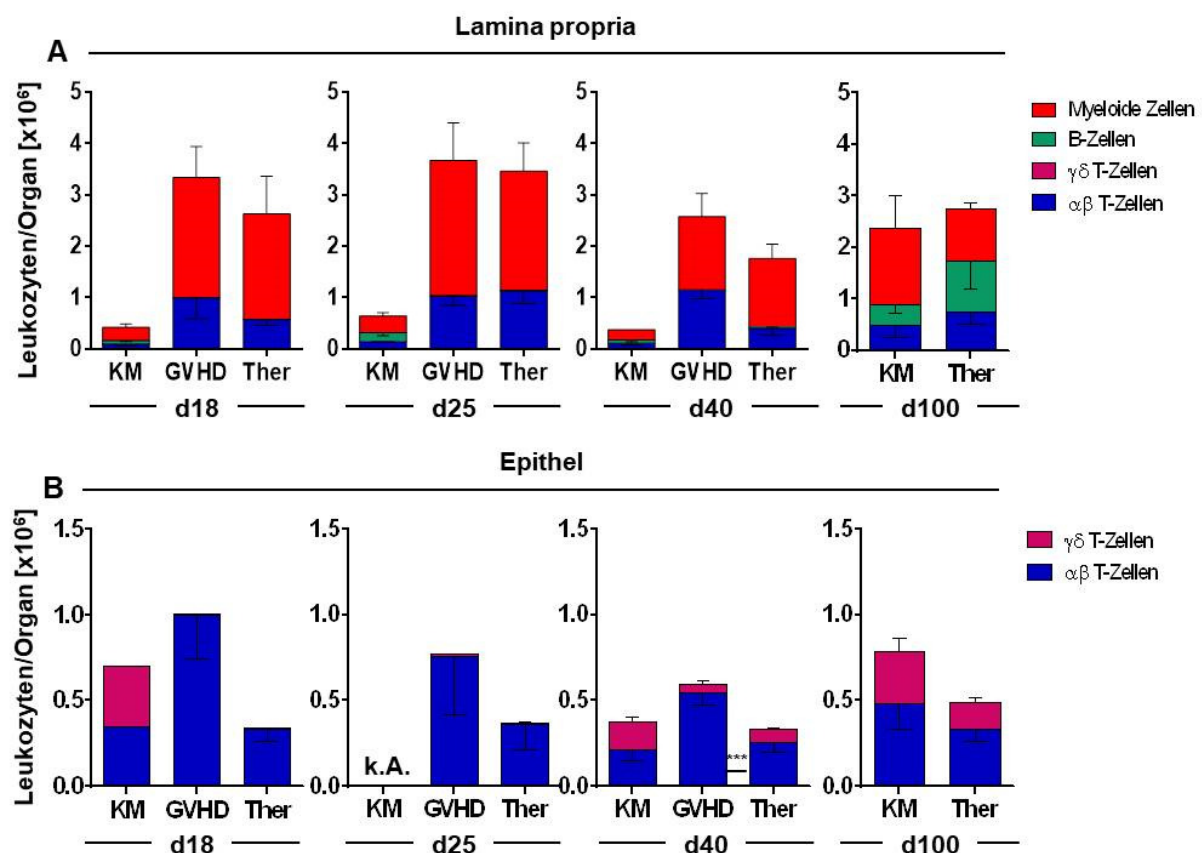


Abb. 4.48: Analyse der Leukozytenpopulationen von Lamina propria und Epithel des Colons nach haploidenter KMT und Treg-Therapie

CB6F1-Empfängermäuse wurden letal bestrahlt und mit $2,5 \times 10^6$ BALB/c KM-Zellen alleine (KM, je $n=3-10$ Zellpools/Zeitpunkt aus je 3-6 Tieren) oder zusammen mit $5,0 \times 10^6$ BALB/c Milzzellen (GVHD, $n=3-8$ Zellpools/Zeitpunkt aus je 3-6 Tieren) transplantiert. Ein Teil der GVHD-Tiere erhielt an d11 nach KMT zusätzlich $5,0 \times 10^6$ in vitro expandierte BALB/c Treg-Zellen (Ther, $n=3-8$ Zellpools/Zeitpunkt aus je 3-6 Tieren). Zu verschiedenen Zeitpunkten nach KMT wurden Tiere aus den einzelnen Gruppen getötet, die im Colon der Tiere enthaltenen Leukozyten auf CD11b (myeloide Zellen), CD19 (B-Zellen), TCR $\gamma\delta$ ($\gamma\delta$ -T-Zellen) und TCR β ($\alpha\beta$ -T-Zellen) gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Aufgrund der geringen Zellzahlen konnten im Epithel des Colons in allen Behandlungsgruppen nur $\gamma\delta$ -T-Zellen und $\alpha\beta$ -T-Zellen analysiert werden. Dargestellt sind MW \pm SEM der absoluten Anzahl der jeweiligen Leukozytenpopulationen in der LP (A) und im Epithel (B) des Colons (k.A. = keine Aussage möglich; *** $p<0,001$).

Da die Treg-Therapie im Colon zu einer Reduktion des zellulären Infiltrats der LP an d40 (siehe Abb. 4.47 A) sowie zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl an $\alpha\beta$ -T-Zellen im Epithel (siehe Abb. 4.48 B) führte, wurde dieser Zeitpunkt im Folgenden differenzierter betrachtet.

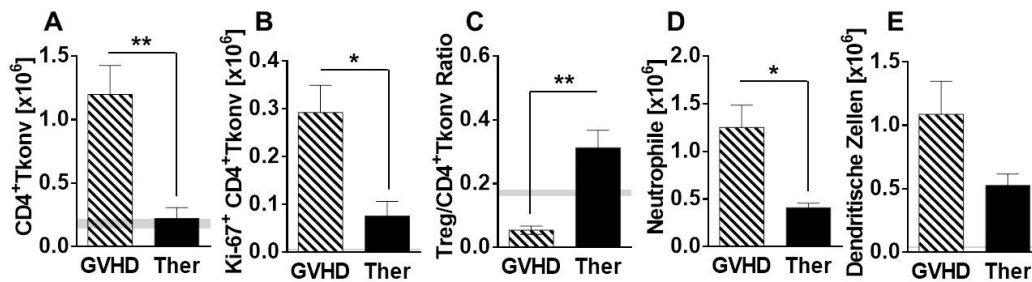


Abb. 4.49: Detaillierte durchflusszytometrische Analyse der Colon LPL an d40 nach KMT

Absolute Anzahl von $CD4^+ Tkonv$ ($CD4^+ Tkonv$, A), proliferierenden ($Ki-67^+$) $CD4^+ Tkonv$ (B), der Treg/ $CD4^+ Tkonv$ -Ratio (C), neutrophilen Granulozyten ($CD11b^+ Gr-1^+$, D) und dendritischen Zellen ($CD11b^+ CD11c^+$, E) in der LP des Colons von CB6F1-Rezipienten an d40 nach KMT und GVHD-Induktion (GVHD) bzw. nach zusätzlicher Treg-Therapie an d11 mit in vitro expandierten Spender-Treg-Zellen (Ther) als MW \pm SEM ($n=4-5$ Zellpools aus je 2-4 Tieren, * $p<0,05$; ** $p<0,01$). Nach Isolation der Colon LPL wurden diese mit Antikörpern für TCR β , CD4, Foxp3, Ki-67, CD11b, Gr-1 und CD11c gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Graue Balken indizieren MW \pm SEM von nicht-transplantierten Referenztieren (CB6F1, $n=3$ Zellpools aus je 5-6 Tieren).

Diese Analysen zeigten in der LP des Colons von Therapie-Tieren an d40 eine signifikant geringere Anzahl an $CD4^+ Tkonv$ (Abb. 4.49 A) als in unbehandelten GVHD-Tieren ($0,22 \pm 0,09 \times 10^6$ versus $1,20 \pm 0,23 \times 10^6$), was vermutlich auf deren verminderter Proliferation in Therapie-Tieren beruhte, worauf die verringerte Anzahl an $Ki-67^+ CD4^+ Tkonv$ -Zellen (Abb. 4.49 B) hindeutet ($0,08 \pm 0,03 \times 10^6$ versus $0,29 \pm 0,06 \times 10^6$). Diese Effekte gingen einher mit einer signifikant höheren Treg/ $CD4^+ Tkonv$ -Ratio (Abb. 4.49 C) von $0,31 \pm 0,05$ versus $0,05 \pm 0,01$ in unbehandelten GVHD-Tieren. Außerdem war die Anzahl an infiltrierenden $CD11b^+ Gr-1^+$ neutrophilen Granulozyten (Abb. 4.49 D) sowie an $CD11b^+ CD11c^+$ dendritischen Zellen (Abb. 4.49 E) im Vergleich zu unbehandelten GVHD-Tieren reduziert.

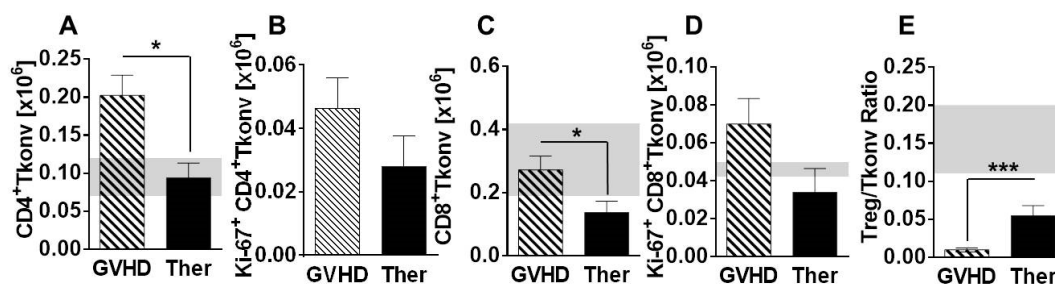


Abb. 4.50: Detaillierte durchflusszytometrische Analyse der Colon IEL an d40 nach KMT

Absolute Anzahl $CD4^+ Tkonv$ ($CD4^+ Tkonv$, A), proliferierender ($Ki-67^+$) $CD4^+ Tkonv$ (B), $CD8^+ Tkonv$ ($CD8^+ Tkonv$, C), proliferierenden ($Ki-67^+$) $CD8^+ Tkonv$ (D) und der Treg/Gesamt-Tkonv-Ratio (E) im Epithel des Colons von CB6F1-Rezipienten an d40 nach KMT und GVHD-Induktion (GVHD) bzw. nach zusätzlicher Treg-Therapie an d11 mit in vitro expandierten Spender-Treg-Zellen (Ther) als MW \pm SEM ($n=4-5$ Zellpools aus je 2-4 Tieren, * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$). Nach Isolation der Colon IEL wurden diese mit Antikörpern für TCR β , CD4, CD8 α , Foxp3 und Ki-67 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Graue Balken indizieren MW \pm SEM von nicht-transplantierten Referenztieren (CB6F1, $n=3$ Zellpools aus je 5-6 Tieren).

Im Epithel des Colons kam es nach Treg-Therapie an d11 zu einer signifikanten Verringerung sowohl der CD4⁺ Tkonv (Abb. 4.50 A) als auch der CD8⁺ Tkonv (Abb. 4.50 C) an d40. Auch hier zeigte sich eine verminderte Proliferationsrate für CD4⁺ (Abb. 4.50 B) und CD8⁺ Tkonv (Abb. 4.50 D) sowie eine signifikant erhöhte Treg/Gesamt-Tkonv-Ratio (Abb. 4.50 E) von $0,06 \pm 0,01$ in Therapie- versus $0,01 \pm 0,003$ in unbehandelten GVHD-Tieren.

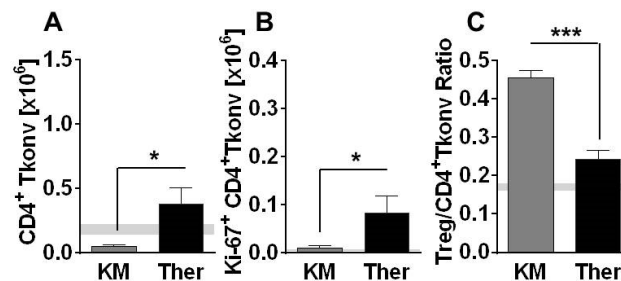


Abb. 4.51: Detaillierte durchflusszytometrische Analyse der Colon LPL an d100 nach KMT

Absolute Anzahl CD4⁺ Tkonv (CD4⁺ Tkonv, A), proliferierenden (Ki-67⁺) CD4⁺ Tkonv (B) und der Treg/CD4⁺ Tkonv-Ratio (C) in der LP des Colons von CB6F1-Rezipienten an d100 nach KMT von KM-Kontrolltieren (KM) oder Treg-Therapie-Tieren (Ther) als MW \pm SEM ($n=6-8$ Zellpools aus je 2-6 Tieren, * $p<0,05$; ** $p<0,01$). Nach Isolation der Colon LPL wurden diese mit Antikörpern für TCR β , CD4, Foxp3 und Ki-67 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Graue Balken indizieren MW \pm SEM von nicht-transplantierten Referenztieren (CB6F1, $n=3$ Zellpools aus je 5-6 Tieren).

Bis zum Versuchsende (d100 nach KMT) hatte sich das Ausmaß des Leukozyteninfiltrats in der LP des Colons Treg-therapierter Tiere weiter reduziert (siehe Abb. 4.49). Trotzdem lagen die Werte für CD4⁺ Tkonv-Zellen mit $0,38 \pm 0,12 \times 10^6$ versus $0,05 \pm 0,18 \times 10^6$ Zellen (Abb. 4.51 A), sowie die Anzahl proliferierender Zellen unter den CD4⁺ Tkonv mit $0,08 \pm 0,04 \times 10^6$ versus $0,01 \pm 0,005 \times 10^6$ Zellen (Abb. 4.51 B) auch zu diesem Zeitpunkt noch höher als in KM-Kontrolltieren. Folgerichtig blieb die Treg/CD4⁺ Tkonv-Ratio bis zum Versuchsende ebenfalls niedriger als in Tieren ohne aGVHD (Abb. 4.51 C), andererseits aber höher als in nicht-transplantierten Mäusen.

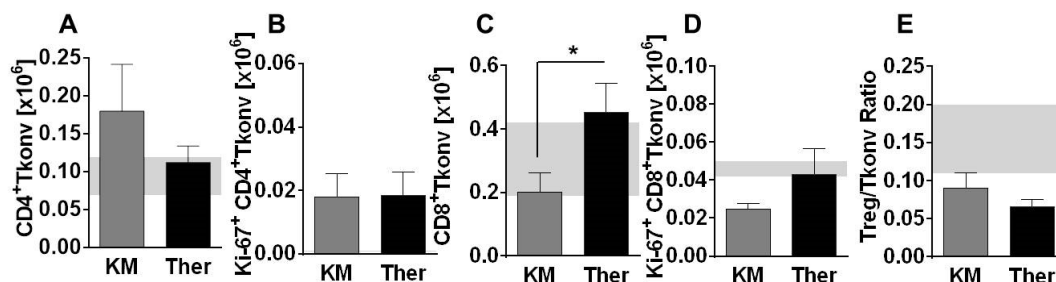


Abb. 4.52: Detaillierte durchflusszytometrische Analyse der Colon IEL an d100 nach KMT

Absolute Anzahl CD4⁺ Tkonv (CD4⁺ Tkonv, A), proliferierender (Ki-67⁺) CD4⁺ Tkonv (B), CD8⁺ Tkonv (CD8⁺ Tkonv, C), proliferierender (Ki-67⁺) CD8⁺ Tkonv (D) und der Treg/Gesamt-Tkonv-Ratio (E) im Epithel des Colons von CB6F1-Rezipienten an d100 nach KMT von KM-Kontrolltieren (KM) oder Treg-Therapie-Tieren (Ther) als MW \pm SEM ($n=6-8$ Zellpools aus je 2-6 Tieren, * $p<0,05$). Nach Isolation der Colon IEL wurden diese mit Antikörpern für TCR β , CD4, CD8 α , Foxp3 und Ki-67 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Graue Balken indizieren MW \pm SEM von nicht-transplantierten Referenztieren (CB6F1, $n=3$ Zellpools aus je 5-6 Tieren).

Im Colonepithel änderte sich die Anzahl an CD4⁺ Tkonv (Abb. 4.52 A) sowie an proliferierenden CD4⁺ Tkonv (Abb. 4.52 B) zwischen d40 (siehe Abb. 4.50) und d100 nach KMT nicht

mehr wesentlich. Allerdings kam es zu einer Zunahme der CD8⁺ Tkonv-Zellen, die jedoch keine verstärkte Proliferation zeigten (Abb. 4.52 C und D). Trotzdem blieb das Treg/Gesamt-Tkonv(CD4⁺ und CD8⁺)-Verhältnis unverändert und lag mit $0,07 \pm 0,01$ versus $0,09 \pm 0,02$ nur unwesentlich unterhalb dem der KM-Kontrolltiere (Abb. 4.52 E). Dies beruhte vor allem auf einem gleichzeitig zu beobachtenden Anstieg der absoluten Anzahl an Treg-Zellen im Colonepithel von $13,5 \pm 2,7 \times 10^3$ an d40 auf $27,0 \pm 4,9 \times 10^3$ an d100 nach KMT. Um zu untersuchen, ob die therapeutisch verabreichten Treg-Zellen nur die Proliferation der alloreaktiven Spender-Tkonv unterdrückten oder auch die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine verringerten, erfolgte eine Bestimmung der entsprechenden mRNA-Spiegel im Colon an d40 (Abb. 4.53) und d100 nach KMT (Abb. 4.54).

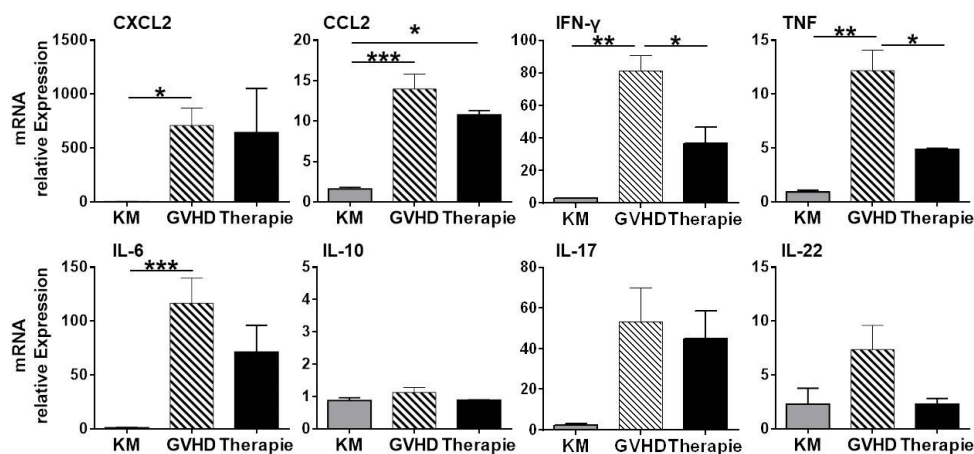


Abb. 4.53: mRNA-Spiegel verschiedener Chemokine und Zytokine des Colons an d40 nach haploidenter KMT

CB6F1-Mäuse wurden letal bestrahlt, mit BALB/c KM-Zellen alleine (KM, n=6) oder zusätzlich mit Milzzellen (GVHD, n=12) transplantiert. Ein Teil der GVHD-Tiere wurde an d11 nach KMT mit *in vitro* expandierten BALB/c Treg therapiert (Therapie, n=3). An d40 nach KMT wurde das Colon entnommen und wie in Abschnitt 3.2.9.1 beschrieben für die mRNA-Isolierung aufgearbeitet. Die Expressionsanalyse erfolgte mittels qRT-PCR mit HPRT als 'housekeeping'-Gen. Dargestellt ist das Expressionsniveau im Vergleich zu nicht-transplantierten Tieren (arbiträr auf 1 gesetzt) als MW \pm SEM (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Während sich die Expression der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF in unbehandelten GVHD-Tieren um das 10-fache bzw. das 2-fache gegenüber d11 nach KMT erhöht hatte (vergleiche hierzu Abb. 4.24), blieb die IFN- γ -Expression unverändert auf einem sehr hohen Niveau. Gleichzeitig stieg die Expression des Chemokins CXCL2 ebenfalls um das etwa 10-fache, nicht aber die des Chemokins CCL2. Die an d11 nach KMT verabreichten *in vitro* expandierten Treg hatten eine signifikant supprimierende Wirkung auf die IFN- γ - und TNF-Expression, weniger ausgeprägt auch auf die von IL-6, nicht aber auf die der Chemokine. Die relativen mRNA-Spiegel der immunregulatorischen Zytokine IL-17 bzw. IL-22 waren in GVHD-Tieren an d40 20-fach bzw. 3-fach gegenüber der Expression an d11 erhöht, während die IL-10-Produktion weder an d11 noch d40 beeinflusst war. Treg-therapierte Tiere zeigten eine eindeutig niedrigere Produktion von IL-22 im Vergleich zu unbehandelten GVHD-Tieren, während die IL-17-Expression an d40 nicht supprimiert wurde.

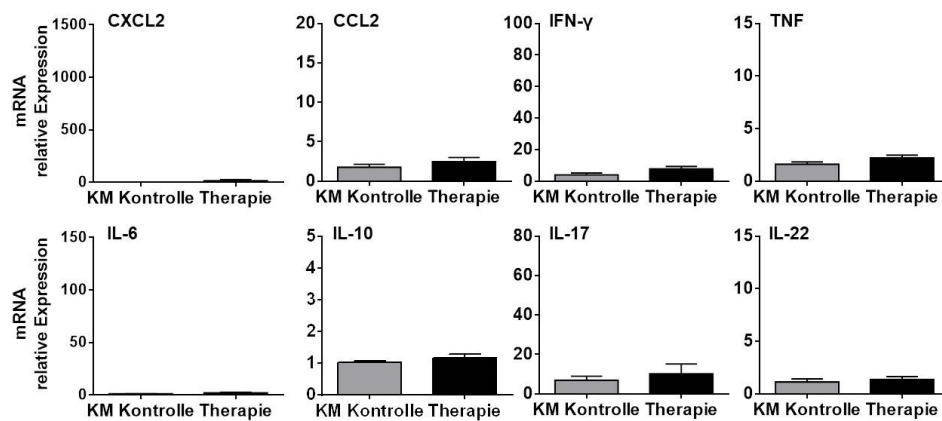


Abb. 4.54: mRNA-Spiegel verschiedener Chemokine und Zytokine des Colons an d100 nach haploidenter KMT

CB6F1-Mäuse wurden letal bestrahlt, mit BALB/c KM-Zellen alleine (KM, $n=9$) oder zusätzlich mit Milzzellen transplantiert und erhielten an d11 nach KMT in vitro expandierte BALB/c Treg-Zellen (Therapie, $n=11$). An d100 nach KMT wurde der Dickdarm entnommen und wie in Abschnitt 3.2.9.1 beschrieben für die mRNA-Isolierung aufgearbeitet. Die Expressionsanalyse erfolgte mittels qRT-PCR mit HPRT als „housekeeping“-Gen. Dargestellt ist das Expressionsniveau im Vergleich zu nicht-transplantierten Tieren (arbiträr auf 1 gesetzt) als $MW \pm SEM$.

Im weiteren Versuchsverlauf bis d100 nach KMT fielen alle untersuchten Chemokin- und Zytokinspiegel in den therapierten GVHD-Tieren auf das Niveau der KM-Kontrolltiere (Abb. 4.54). Diese wiesen gegenüber nicht-transplantierten Kontrolltieren lediglich noch eine leicht erhöhte Expression von IFN- γ ($4,03 \pm 1,16$ -fach) und IL-17 ($6,93 \pm 2,06$ -fach) auf, während die Expression aller anderen Zytokine und Chemokine im Normbereich lag.

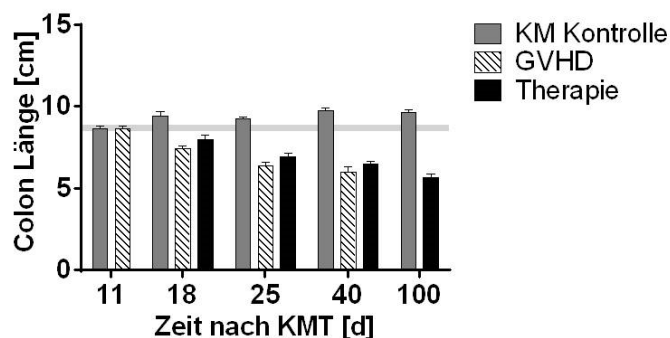


Abb. 4.55: Länge des Colons nach haploidenter KMT und Treg-Therapie

Länge des Colons von unbehandelten (GVHD, $n=4-6$) und Treg-therapierten GVHD-Tieren (Therapie, $n=6-24$) sowie KM-Kontrolltieren (KM Kontrolle, $n=3-6$) bei Entnahme zu den angegebenen Zeitpunkten nach KMT.

Trotz der deutlichen Effekte der an d11 verabreichten Spender-Treg-Zellen auf Anzahl, Proliferation, Zusammensetzung und inflammatorische Aktivität der GVHD-induzierenden konventionellen Spender-T-Zellen waren auch an d100 nach KMT noch Anzeichen anhaltender Gewebeschäden im GI-Trakt von therapierten GVHD-Tieren erkennbar (vergleiche dazu den histologischen Score in Abb. 4.30). Dies spiegelte sich auch in einer Verringerung der Colonlänge wieder, die in der Effektorphase der aGVHD (zwischen d25 und d40) in therapierten GVHD-Tieren ebenso ausgeprägt war wie in unbehandelten GVHD-Tieren und

sich auch bis d100 nach KMT in ansonsten erfolgreich therapierten Tieren nicht wieder verbesserte (siehe Abb. 4.55).

Zusammenfassend zeigten die detaillierten Darmanalysen, dass die schweren Gewebeschäden in Dick- und Dünndarm nach Treg-Therapie weitgehend reversibel sind, residuelle Veränderungen aber insbesondere im Dickdarm zu beobachten waren. Die Treg-Therapie durchbrach die Einwanderung und/oder die Proliferation von Tkonv-Zellen, das inflammatorische Zytokinmilieu und den Influx von Granulozyten. Die Eindämmung der Alloreaktion und Inflammation führte zur weitgehenden Normalisierung des mukosa-assoziierten lymphatischen Systems. Die anhaltende Verkürzung des Colons sowie residuelle histologische Veränderungen deuteten jedoch auf eine noch nicht abgeschlossene Regenerationsphase in den Treg-therapierten Tieren hin und/oder auf den Umstand, dass manche Gewebeschäden irreversibel sein könnten.

4.3.8 Verbesselter Therapieerfolg nach wiederholter Verabreichung therapeutischer Treg

Um zu testen, ob die Effektivität der Therapie der aGVHD durch eine wiederholte Gabe von Treg-Zellen verbessert werden kann, wurden diese an d11 und zusätzlich an d18 nach KMT jeweils in einer Dosis von $5,0 \times 10^6$ Zellen appliziert (Abb. 4.56).

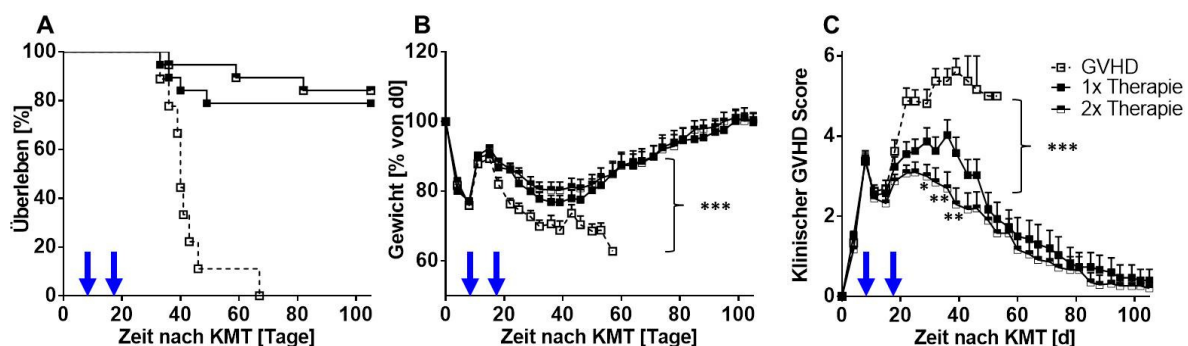


Abb. 4.56: Überleben, Gewicht und klinischer GVHD-Score nach 1-maliger versus 2-maliger Treg-Gabe

*CB6F1-Empfängermäuse wurden letal bestrahlt und mit $2,5 \times 10^6$ Knochenmark- zusammen mit $5,0 \times 10^6$ BALB/c Milzzellen transplantiert. Ein Teil der Tiere erhielt an d11 nach KMT zusätzlich in vitro expandierte BALB/c Treg-Zellen (■, 1x Therapie, n=19), ein Teil der Tiere erhielt an d11 und d18 in vitro expandierte BALB/c Treg-Zellen (■, 2x Therapie, n=20), die restlichen Tiere erhielten keine Treg (□, GVHD, n=9). Dargestellt sind Überleben (A), Gewicht (B, als Prozent des Ausgangsgewichts) und klinischer GVHD Score (C). Gezeigt sind die kumulativen Ergebnisse aus zwei unabhängigen Experimenten (MW \pm SEM; *** $p < 0,001$). Die blauen Pfeile markieren die Zeitpunkte der Treg-Gabe.*

Im Vergleich zu den vorangegangenen Treg-Therapie-Versuchen war die Effektivität einer einmaligen Behandlung mit therapeutischen Treg-Zellen in diesen Experimenten besonders hoch, was sich in einer überdurchschnittlich guten Überlebensrate von 78,95% (Abb. 4.56 A), einer kompletten Regeneration des Ausgangsgewichts (Abb. 4.56 B) sowie dem nur noch geringen klinischen GVHD-Score (Abb. 4.56 C) von $0,40 \pm 0,28$ an d100 nach KMT widerspiegelte. Trotzdem konnte die Effektivität der Treg-Therapie durch eine weitere Gabe

therapeutischer Treg noch verbessert werden: So stieg die Überlebensrate auf 84,21% und obwohl kein Vorteil anhand der Gewichtszunahme zu erkennen war, konnte der initiale Anstieg des klinischen Scores zwischen d20 und d40 nach KMT (nach einmaliger Treg-Therapie auf maximal $4,03 \pm 0,38$) signifikant schneller und nachhaltiger unterdrückt werden (vor allem durch die verminderte Haut-GVHD und die verbesserte Körperhaltung [Kyphose]), so dass er nur noch maximal $3,10 \pm 0,25$ betrug. Inwieweit diese Verbesserung des Allgemeinzustandes sich in Art und Ausmaß der Gewebeschäden in lymphatischen und gastrointestinalen Zielorganen der aGVHD widerspiegelte, wurde im Folgenden näher untersucht.

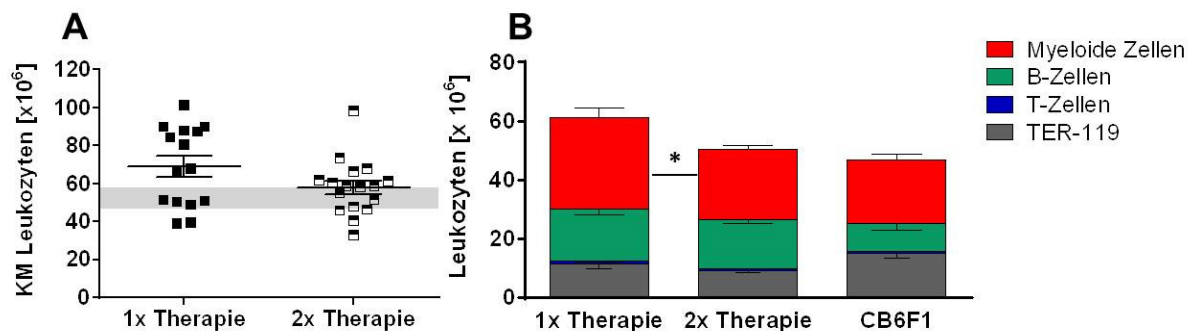


Abb. 4.57: Zellularität und Zusammensetzung des Knochenmarks nach 1-maliger bzw. 2-maliger Treg-Gabe

CB6F1-Mäuse wurden transplantiert und therapiert wie in der Legende zu Abb. 4.56 beschrieben. Am Versuchsende (d100 nach KMT) wurde die Zellzahl im KM (A, Leukozyten/2 Hinterläufe) ermittelt und die zelluläre Zusammensetzung nach Färbung der KM-Zellen mit Antikörpern für TER-119 (erythrozytäre Vorläufer), TCR β (T-Zellen), CD19 (B-Zellen) und CD11b (myeloide Zellen) durchflussmetrisch analysiert (B). Nicht-transplantierte CB6F1-Mäuse (n=3) dienten als Referenz. Dargestellt sind MW \pm SEM (* $p < 0,05$).

Im KM zeigten sich am Versuchsende (d100 nach KMT) hinsichtlich der Zellularität keine signifikanten Unterschiede zwischen einmaliger und zweimaliger Treg-Gabe, allerdings näherten sich die Werte 2x therapierten Tiere weiter denen nicht-transplantierten Kontrolltiere an (Abb. 4.57 A). Dies war hauptsächlich auf eine signifikante Verringerung der Anzahl myeloischer Zellen und damit einer zunehmenden Normalisierung der zellulären Zusammensetzung des KM-Zellpools in zweifach therapierten Tieren zurückzuführen (Abb. 4.57 B).

Eine genaue Analyse der B-Zellfraktionen im KM erbrachte keine signifikanten Unterschiede zwischen einfacher und zweifacher Treg-Therapie (Abb. 4.58). Allerdings enthielt das KM in beiden Therapie-Gruppen deutlich höhere relative und absolute B-Zellzahlen (Abb. 4.57 B und Abb. 4.58) als nicht-transplantierte CB6F1-Mäuse, was vor allem auf eine signifikante Erhöhung der Prä-B-Zellen (Fraktion D) zurückzuführen war und damit deutlich auf eine noch andauernde Regeneration des B-Zellkompartiments in den therapierten Tieren hinweist. Dies wurde auch durch die Ergebnisse der nachfolgenden Milzanalyse bestätigt.

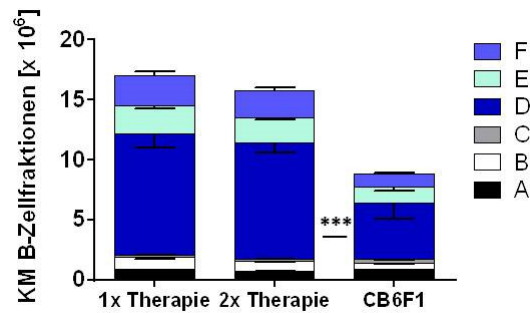


Abb. 4.58: B-Zell-Fraktionen im KM nach 1-maliger bzw. 2-maliger Treg-Gabe

CB6F1-Mäuse wurden transplantiert und therapiert wie in der Legende zu Abb. 4.56 beschrieben. Am Versuchsende (d100 nach KMT) wurden die KM-Zellen mit Antikörpern gegen B220, CD43, IgD, IgM, BP-1 und CD24 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die einzelnen B-Zellfraktionen im KM nach Hardy (227). Als Referenz dienten nicht-transplantierte CB6F1-Mäuse (CB6F1, n=3). Gezeigt sind MW \pm SEM (***) $p < 0,001$.

In den oben gezeigten Experimenten war die Zellularität der Milz selbst bei erfolgreicher einmaliger Treg-Therapie (Überleben der therapierten Tiere > 100d) stark beeinträchtigt (Abb. 4.37 B). In den vergleichenden Analysen zur sequentiellen Treg-Therapie wurden an d100 nach KMT aus der Milz $45,44 \pm 7,42 \times 10^6$ Zellen nach einmaliger Treg-Therapie isoliert und $79,28 \pm 10,96 \times 10^6$ Zellen nach zweimaliger Therapie. Damit wurde fast die Zellzahl nicht-transplantierten CB6F1-Tiere ($109,70 \pm 2,73 \times 10^6$) erreicht. Die verbesserte lympho-/hämatopoietische Rekonstitution nach zweifacher Treg-Therapie betraf vor allen Dingen die B-Zellen, deren Anzahl mit $56,16 \pm 7,91 \times 10^6$ signifikant höher lag als in einfach therapierten Tieren ($32,12 \pm 5,17 \times 10^6$) und damit nur noch leicht unterhalb der B-Zellzahl in nicht-transplantierten CB6F1-Tieren ($61,45 \pm 3,17 \times 10^6$).

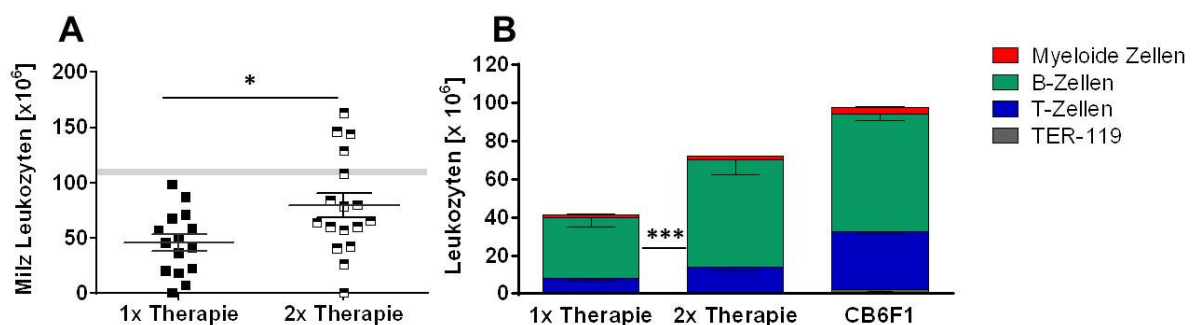


Abb. 4.59: Zellularität und Zusammensetzung der Milz nach 1-maliger bzw. 2-maliger Treg-Gabe

CB6F1-Mäuse wurden transplantiert und therapiert wie in der Legende zu Abb. 4.56 beschrieben. Am Versuchsende (d100 nach KMT) wurde die Zellzahl in der Milz (A) ermittelt und die zelluläre Zusammensetzung nach Färbung der Milzzellen mit Antikörpern für TER-119 (erythrozytäre Vorläufer), TCR β (T-Zellen), CD19 (B-Zellen) und CD11b (myeloide Zellen) durchflusszytometrisch analysiert (B). Nicht-transplantierte CB6F1-Mäuse (n=3) dienten als Referenz. Dargestellt sind MW \pm SEM (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

Dies war vor allem auf eine bessere Rekonstitution der follikulären B-Zellen zurückzuführen, deren Zellzahl mit $46,70 \pm 6,54 \times 10^6$ signifikant gegenüber der in einfach therapierten Tieren mit $27,15 \pm 4,42 \times 10^6$ erhöht war und sich so weiter den B-Zellzahlen in nicht-transplantierten CB6F1-Mäusen mit $51,12 \pm 1,92 \times 10^6$ annäherte (Abb. 4.60). Zusammen mit den Ergebnissen

der KM-Analyse unterstreichen diese Daten den verstärkten therapeutischen Effekt einer wiederholten Treg-Gabe auf das lympho-/hämatopoietische System und dessen Rekonstitution nach haploidenter KMT. Darüber hinaus weisen diese Daten darauf hin, dass die intensivierte Treg-Therapie unter Umständen auch die GVHD-induzierte Fibrosierung der Milz verhindern kann.

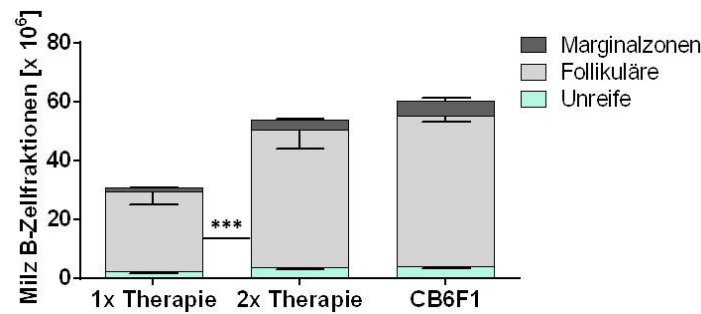


Abb. 4.60: B-Zell-Fraktionen in der Milz nach 1-maliger bzw. 2-maliger Treg-Gabe

CB6F1-Mäuse wurden transplantiert und therapiert wie in der Legende zu Abb. 4.56 beschrieben. Am Versuchsende (d100 nach KMT) wurden die Milzzellen mit Antikörpern gegen CD19, CD21 und CD23 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die Anzahl CD19⁺CD23⁺CD21^{dim} unreifer B-Zellen, CD19⁺CD23⁺CD21^{dim} follikulärer B-Zellen und CD19⁺CD23⁺CD21^{high} Marginalzonen-B-Zellen in der Milz. Als Referenz dienten nicht-transplantierte CB6F1-Mäuse (CB6F1, n=3). Gezeigt sind MW ± SEM (***) $p < 0,001$.

Schwerste GVHD-induzierte Schäden im Colon konnten durch die einmalige Treg-Therapie verhindert werden. Nach zweimaliger Treg-Gabe (Abb. 4.61) kam es sowohl zu einer signifikanten Verbesserung der Colonlänge (von $5,61 \pm 0,22$ cm auf $9,50 \pm 0,32$ cm) als auch des histopathologischen GVHD-Scores (von $4,10 \pm 0,46$ auf $1,71 \pm 0,19$), beides eindeutige Hinweise auf eine signifikant verbesserte Regeneration des intestinalen Gewebes.

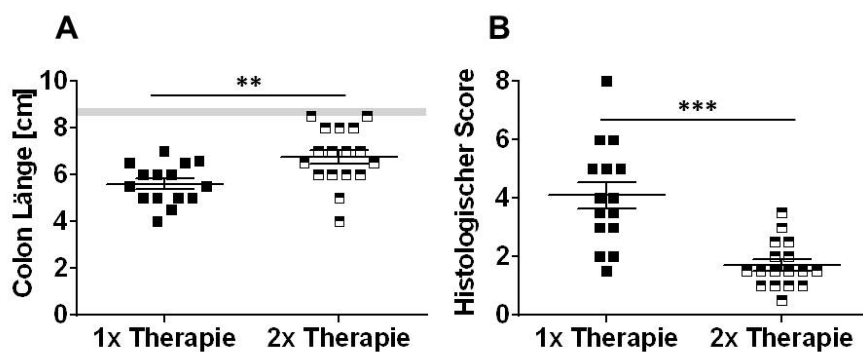


Abb. 4.61: Colonlänge und histologischer Score nach 1-maliger bzw. 2-maliger Treg-Gabe

CB6F1-Mäuse wurden transplantiert und therapiert wie in der Legende zu Abb. 4.56 beschrieben. Am Versuchsende (d100 nach KMT) wurde das Colon entnommen und vermessen (A), danach in Paraffin eingebettet, mit H/E gefärbt und evaluiert (B, durchgeführt von Elisabeth Huber, Institut für Pathologie, UKR). Dargestellt sind MW ± SEM (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Der graue Balken in (A) zeigt MW ± SEM der Colonlänge nicht-transplantierte CB6F1-Tiere an.

Zusammenfassend konnte durch die wiederholte Gabe *in vitro* expandierter Spender-Treg-Zellen eine Verstärkung ihrer therapeutischen Wirkung in der Effektorphase der aGVHD

beobachtet werden. Die repetitive Gabe führte zu einem verbesserten Schutz lymphatischer und gastrointestinaler Gewebe vor GVHD-induzierten Schäden, einer verbesserten Geweberegeneration und einer weiteren Verbesserung der Überlebensrate im Vergleich zur einmaligen Treg-Therapie.

5 Diskussion

Die allogene HSZT ist eine kurative Therapieoption für eine Reihe maligner und nicht-maligner hämatologischer Erkrankungen. Die als Konditionierung bezeichnete Vorbehandlung der Patienten muss das Immunsystem des Empfängers supprimieren, um eine Abstoßung des Transplantats zu verhindern, im Empfängermark ausreichend Platz schaffen, um die Einnistung der Spenderstammzellen (*engraftment*) zu gewährleisten und bei maligner Grunderkrankung sollen residuelle Leukämie-/Lymphomzellen möglichst eradiziert werden. Darüber hinaus muss die Konditionierung zusammen mit der anschließenden Immunsuppression die kotransplantierten Spender-T-Zellen supprimieren, um die Entwicklung einer GVHD zu verhindern. Gelingt die allogene SZT ohne Komplikationen, regeneriert die Hämatopoese aus den Stammzellen nach der 14-28-tägigen Aplasiephase und die neu generierten T-Zellen werden durch die Positiv- und Negativselektion im Empfängerthymus tolerant für Empfängerantigene. Die kotransplantierten reifen T-Zellen unterliegen natürlich nicht diesen zentralen Toleranzmechanismen und können deshalb Transplantationskomplikationen wie die akute oder chronische GVHD hervorrufen. Um diese Komplikationen zu vermeiden, wurden z.B. T-Zell-depletierte Transplantate eingesetzt oder Transplantationen zwischen eineiigen Zwillingen durchgeführt. In solchen Studien wurde allerdings beobachtet, dass die GVHD zwar verhindert, die Überlebensrate aber nicht verbessert wurde, da viele Patienten am Leukämieerzidiv verstarben. Diese und andere Beobachtungen legen nahe, dass reife Spender-T-Zellen im Transplantat eine zentrale Bedeutung für den Erfolg dieser Therapie haben, da sie wesentlich zur Eliminierung der Empfängerhämatopoese beitragen (*graft-versus-hematopoiesis-effect*) und damit gleichfalls Leukämiezellen eradizieren (*graft-versus-leukemia-effect*) (228). Die Regeneration der Myelopoese erfolgt relativ rasch nach allogener SZT, so dass die Neutropeniephase mit ihrem hohen Risiko für Pilz- und bakterielle Infektionen in der Regel nach 14-28 Tagen überwunden ist (229). Selbst bei komplikationslosem Transplantationsverlauf ist die Regeneration der Lymphopoese aber deutlich verzögert, weshalb es insbesondere in den ersten 100 Tagen nach SZT zu Virusreaktivierungen und opportunistischen Infektionen kommen kann. In dieser frühen Phase besteht das T-Zell-Kompartiment hauptsächlich aus kotransplantierten reifen Gedächtnis-T-Zellen, die peripher durch homöostatische Proliferation oder Antigen-getriebenen expandieren und in Abhängigkeit vom Serostatus des Spenders zum Schutz vor Virusreaktivierungen beitragen (230). Da CD8⁺ T-Zellen unter diesen Umständen besser expandieren, kommt es zu einer Verschiebung der CD4/CD8-Ratio. Die Regeneration des T-Zell-Kompartiments aus Spender-Stammzellen via Positiv- und Negativselektion im Empfängerthymus benötigt mehrere Monate und verzögert sich zusätzlich mit zunehmendem Empfängeralter. Da die B-Zell-Entwicklung und Reifung stark von der Interaktion mit CD4⁺ T-

Zellen abhängt, ist auch die humorale Funktion langfristig beeinträchtigt, so dass Impfungen frühestens 6 Monate nach SZT sinnvoll, unter Umständen aber erst nach 1-2 Jahren erfolgreich sind (229, 231). Entwickeln Patienten nach allogener SZT eine aGVHD, wird die Lymphoregeneration deutlich gestört. Hierzu trägt die dann erforderliche Immunsuppression, aber auch die Alloreaktion selbst bei. Im Rahmen der aGVHD werden neben den Zielorganen Haut, Leber und Darm auch die primären (Thymus und KM) und sekundären (Milz, LK) Lymphorgane angegriffen, sodass die Lymphopoese nachhaltig gestört wird (224, 231-233). Alloreaktive T-Zellen können T-Zell-Vorläufer im Thymus über den Fas/FasL-Signalweg in Apoptose treiben und die T-Zell-Entwicklung durch die Sekretion inflammatorischer Zytokine stören (234, 235). Darüber hinaus werden im Rahmen der aGVHD hämatopoietische Nischen im KM zerstört, was zu einer langanhaltenden Repression vor allem der B-Zell-Rekonstitution führt (236, 237). In den Lymphknoten kommt es durch die protrahierte Inflammation zur Lymphknotenatrophie und in der Milz zu Architekturstörungen und Fibrosierung (238). Die hohe Morbidität und Mortalität der schweren aGVHD wird vor allem durch die Darmbeteiligung ausgelöst. Hier treffen alloreaktive T-Zellen unter Umständen auf ein bereits durch die Konditionierung beeinträchtigtes Gewebe. Die gestörte Barrierefunktion der intestinalen Epithelien durch die Konditionierung und/oder die lokale Inflammation fördern die T-Zell-Reaktion, was die Apoptoseinduktion im intestinalen Epithel, vor allem in den schnell proliferierenden Krypten, zur Folge hat und die Epithelregeneration einschränkt (182, 239). Die gestörte Barrierefunktion verursacht die Translokation von Bakterien und immunstimulatorischen mikrobiellen Produkten (PAMPs) aus dem Darmlumen (136, 140), was die Inflammation und Zytokinfreisetzung aggraviert (113, 136) und die Antigenpräsentation und Kostimulationskapazität von APCs und Epithelzellen in einem *circulus vitiosus* weiter antreibt (142, 240). Ähnliche Mechanismen laufen in den Zielorganen Leber und Haut ab und führen auch dort zu schweren Gewebeschäden.

Zur Behandlung der aGVHD werden hochdosiert Kortikosteroide eingesetzt. Bei Therapieversagen steht keine zugelassene Zweitlinientherapie zur Verfügung und je nach Präferenz und Erfahrung des Transplantationszentrums werden Steroide mit anderen Immunsuppressiva kombiniert, z.B. mit mTOR-Inhibitoren, TNF-Antagonisten, Purinsynthesehemmern, MMF, Signaltransduktionshemmern wie Ruxolitinib oder T-Zell-depletierenden Antikörpern oder Seren (241). Dadurch steigt aber auch das Risiko für opportunistische Infektionen und diese Kombinationstherapien werden in manchen Studien mit höherer Nicht-Rezidiv-vermittelter Mortalität in Verbindung gebracht (187). Bei Nichtansprechen auf die Zweitlinientherapie steigt das Mortalitätsrisiko auf über 90% trotz des Einsatzes weiterer Immunsuppressiva. Diese katastrophalen Therapieergebnisse weisen darauf hin, dass die sequentielle pharmakologische Immunsuppression die Alloreaktion nicht durchbrechen kann und die Stärkung physiologischer Immunregulations- und Geweberegenerationsmechanismen

eine sinnvolle Alternative sein könnte. Im Jahr 1995 beschrieben Shimon Sakaguchi et al. (27) erstmals CD4⁺ Treg-Zellen, und zeigten, dass sie im Thymus generiert werden, konstitutiv CD25 exprimieren und zur Aufrechterhaltung der immunologischen Toleranz beitragen, indem sie die Aktivierung und Expansion autoreaktiver Zellen in der Peripherie unterdrücken ohne selbst inflammatorische Reaktionen auszulösen (18, 192). Aufgrund ihrer Unfähigkeit inflammatorische Zytokine zu sezernieren und ihrer verminderten Proliferationsaktivität nach Stimulation wurden sie als anerg beschrieben. Diese funktionellen Eigenschaften, nämlich Anergie bei gleichzeitig starker suppressiver Aktivität, weckte das Interesse von Transplantationsimmunologen bezüglich ihrer Funktion in der allogenen SZT. Die Betreuer dieser Arbeit, Matthias Edinger und Petra Hoffmann, waren zeitgleich mit zwei anderen Arbeitsgruppen die ersten, die die suppressive Wirkung von Spender-Treg in der SZT beschrieben (193, 195, 197). In tierexperimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass der adoptive Transfer von Spender-Treg im 1:1 Verhältnis mit Tkonv die aGVHD nach MHC-differenter KMT komplett verhindern kann (197). Für die Prävention der aGVHD mussten Treg in der Lage sein, in sekundäre Lymphorgane zu migrieren, wo sie die frühe Expansion alloreaktiver T-Zellen inhibieren (200, 202). Es kam hierbei aber nicht zu einer Depletion alloreaktiver Tkonv-Zellen, so dass deren Restaktivität ausreichte um GVL-Reaktionen zu vermitteln und residuelle Leukämie- und Lymphomzellen zu eliminieren (196, 198). Ngyuen et al. (238) und Gaidot et al. (242) zeigten dann, dass die aGVHD-Prophylaxe mit frisch isolierten bzw. mit *in vitro* mit Rezipienten-spezifischen APC's selektierten Treg die Immunrekonstitution nicht behindert, sondern durch die Unterdrückung der aGVHD sogar fördert. Dies war nur zum Teil auf den Schutz des Thymusgewebes durch Spender-Treg zurückzuführen, da eine verbesserte Immunfunktion auch in thymektomierten Empfängern zu beobachten war. Für den Schutz vor aGVHD waren nur thymusstämmige Treg geeignet, während induzierte Treg keine protektive Wirkung zeigten (207, 208). Diese tierexperimentellen Ergebnisse konnten in ersten klinischen Studien bestätigt werden (211, 243). In der haploidenten SZT verhinderte der adoptive Transfer von Spender-Treg-Zellen die Auslösung einer aGVHD, obwohl keine pharmakologische Immunsuppression verabreicht wurde und T-Zell-Zahlen verabreicht worden waren, die andernfalls in dieser Transplantationskonstellation eine schwere aGVHD hätten auslösen müssen. Im Vergleich zu historischen Kontrollen waren nicht nur weniger Leukämierückfälle zu beobachten (243), sondern auch eine Verbesserung der Immunrekonstitution, so dass frühzeitig CMV-reaktive T-Zellen nachgewiesen werden konnten sowie eine rasche B-Zellrekonstitution innerhalb von nur drei Monaten (211). Von diesen bahnbrechenden Befunden ermutigt, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob Spender-Treg nicht nur prophylaktisch, sondern auch therapeutisch bei aGVHD wirksam sind. Hierfür mussten sie die bereits angelaufene Alloreaktion inhibieren und die Geweberegeneration sowie die Immunrekonstitution fördern. Diese Fragestellungen wurden bisher noch nicht

untersucht, in zwei Publikationen wurde lediglich eine Überlebensverlängerung bei bereits bestehender aGVHD durch Spender-Treg beschrieben, ohne dass zugrundeliegende Mechanismen untersucht worden wären (202, 244).

Eines der größten Hindernisse für die Durchführung einer adoptiven Treg-Therapie in Patienten mit aGVHD stellt die geringe Frequenz der Treg im peripheren Blut der Spender dar. Dies macht eine *in vitro* Expansion der Zellen erforderlich, weshalb in den letzten Jahren erstmals von der eigenen Arbeitsgruppe, im Verlauf auch von anderen Gruppen entsprechende Protokolle für humane Treg entwickelt wurden (209, 212-215). Für die tierexperimentellen Untersuchungen dieser Arbeit wurde das bereits in der Arbeitsgruppe etablierte Protokoll für humane Zellen für die *in vitro* Expansion muriner Treg modifiziert und optimiert. Dabei war, ähnlich wie im humanen System, nicht nur die Wahl der Stimulations- und Kostimulationsreagenzien entscheidend, sondern auch die Strategie zur Identifizierung und Isolierung einer geeigneten Ausgangspopulation. Ein Teil der milzständigen CD4⁺CD25⁺ T-Zellen, die in unbehandelten Mäusen fast ausschließlich aus Treg Zellen bestehen, exprimiert zusätzlich CD62L und CCR7 und zeigt damit einen naiven Phänotyp. Die durchflusszytometrische Reanalyse FACS-sortierter Subpopulationen ergab, dass über 96% der CD4⁺CD25⁺CD62L⁺ T-Zellen den Treg-spezifischen Transkriptionsfaktor Foxp3 exprimierten, während die CD4⁺CD25⁺CD62L⁻ Population mit über 10% Foxp3⁻ Zellen eine deutliche Kontamination mit Nicht-Treg-Zellen aufwies. Die Zellen wurden mit CD3/CD28-beladenen Beads und hochdosiertem rekombinanten humanen IL-2 (2000 U/ml) für 14 Tage stimuliert. Dadurch konnte eine stabile Expansion der FACS-sortierten CD4⁺CD25⁺CD62L⁺ T-Zellen aus BALB/c Mäusen von etwa 86,6 ± 5,9-fach erreicht werden. CD4⁺CD25⁺CD62L⁺ T-Zellen aus C57Bl/6-Mäusen expandierten mit 77,5 ± 10,0-fach geringfügig schlechter. Deutlich geringer und wesentlich variabler fiel dagegen die Expansion der CD4⁺CD25⁺CD62L⁻ T-Zellen aus beiden Mausstämmen (mit 54,3 ± 11,1-fach aus BALB/c und 29,5 ± 7,0-fach aus C57BL/6) aus, die zusätzlich im Verlauf der 14-tägigen Kultur fast vollständig ihre Foxp3 Expression verloren. Im Gegensatz dazu behielten CD62L⁺ Treg-Zellen ihren Foxp3⁺ Phänotyp und damit auch ihre immunsuppressiven Fähigkeiten bis zum Ende der *in vitro* Expansion. Ein ähnliches Phänomen wurde von Mitgliedern der Arbeitsgruppe auch schon für humane Treg-Zellen beschrieben (214). Auch hier behielten nur naive CD45RA⁺ Treg-Zellen während der *in vitro* Expansion ihre Foxp3-Expression, während CD45RA⁻ Treg sowohl ihre Foxp3-Expression als auch ihre suppressive Aktivität über den Kulturverlauf verloren. Während es sich hierbei jedoch um eine kultur- und stimulationsbedingte Herunterregulation von Foxp3 handelte, liegen den in der vorliegenden Arbeit beobachteten phänotypischen Veränderungen muriner CD62L⁻ Treg-Zellen nach *in vitro* Expansion andere Mechanismen zu Grunde. Durch den Einsatz von Foxp3-Reportermausen, die GFP unter der Kontrolle des Foxp3 Promoters exprimieren, wurde bewiesen, dass der Foxp3-Verlust bei Kultur der Gesamtpopulation von CD4⁺CD25⁺CD62L⁻

T-Zellen auf ein Überwachsen der Kultur durch initial Foxp3-negative Kontaminanten zurückzuführen war, da FACS-sortierte CD62L⁻GFP⁺ Treg-Zellen nach Expansion zu beinahe 100% Foxp3⁺ blieben und sich damit wie CD62L⁺ Treg verhielten. Da ähnliche Ergebnisse zuvor auch schon von der Arbeitsgruppe um Jeff Bluestone bei der *in vitro* Expansion von murinen Treg für die Behandlung des Typ 1 Diabetes beobachtet worden waren (223), wurden für alle weiteren Untersuchungen ausschließlich CD62L⁺ Treg für die *in vitro* Expansion eingesetzt.

In vitro expandierte CD62L⁺ Treg exprimierten neben Foxp3 mit Helios und Neuropilin-1 zwei weitere Moleküle die, wenn auch kontrovers diskutiert, als Marker für thymusstämmige, natürliche Treg angesehen werden. Helios ist ein Transkriptionsfaktor der Ikaros-Familie, deren Mitgliedern eine entscheidende Rolle in der Entwicklung und Funktion des Immunsystems zugesprochen wird. In Treg-Zellen scheint er vor allem für die Suppression von T_H1-Immunantworten sowie die Regulation von T_H17-Zellen wichtig zu sein, wie in Versuchen mit Treg-spezifischen Helios-knock-out Tieren gezeigt werden konnte (245). Während einige Autoren eine tTreg-spezifische Expression von Helios postulieren (246, 247), wird dies von anderen angezweifelt (248, 249). Neuere Studien unter Einsatz von Mäusen die ein 'fate-mapping' erlauben (250) bestätigten lediglich eine präferentielle, nicht aber die exklusive Expression von Helios auf tTreg. Ähnlich wie Helios wird auch Neuropilin-1 von einigen Gruppen als tTreg-spezifischer Marker beschrieben (40, 251). Auch hier ergaben neuere Untersuchungen, dass das Oberflächenprotein auch auf peripher induzierten Treg nach *in vitro* Stimulation hochreguliert wird und deshalb nur eingeschränkt als diskriminierender Marker von tTreg und pTreg angesehen werden kann (250). Das hohe Expressionslevel für beide Marker auf den für diese Arbeit isolierten Treg sowie ihr weiterer Anstieg im Kulturverlauf unterstützen aber die Hypothese, dass es sich bei der Ausgangspopulation überwiegend um thymusstämmige Treg handelt. Einen zusätzlichen Hinweis für die phänotypische und funktionelle Stabilität der CD62L⁺ Treg-Subpopulation ergab die Bestimmung ihres Zytokinprofils nach *in vitro* Expansion. Sie sezernierten keine pro-inflammatorischen Zytokine und insbesondere kein IL-2, interessanterweise allerdings auch kaum IL-10, wiederum eine Parallele zu *in vitro* expandierten humanen naiven Treg (252).

Zur weiteren Charakterisierung *in vitro* expandierter Treg wurden relevante Migrationsfaktoren untersucht. Interessanterweise zeigten die Zellen auch nach intensiver Stimulation und starker Proliferation während der *in vitro* Kultur eine anhaltend hohe Expression von CD62L, das normalerweise nur von naiven T-Zellen exprimiert wird und nach Antigenerkennung und Differenzierung in Effektorzellen verloren geht (253, 254). Eine konstant hohe Expression von CD62L wurde auch von anderen Gruppen beobachtet, z.B. nach antigenspezifischer oder polyklonaler Aktivierung *in vitro* (223, 255) und *in vivo* in Tumor-assoziierten Lymphknoten (256). Dieses Charakteristikum von Treg zusammen mit ihrer anhaltend hohen CCR7-

Expression könnte darauf hinweisen, dass die Zellen auch nach *in vitro* Expansion die Fähigkeit behalten in Lymphknoten einzuwandern (257-259), wo sie nach Antigenkontakt das Signal zur Expression gewebespezifischer Migrationsmoleküle erhalten (258, 260, 261). Da die Treg-Zellen zur Behandlung einer schweren GI-GVHD eingesetzt werden sollten, wurde auch die Expression anderer Homingrezeptoren wie LPAM-1, CCR9 und CD103 untersucht, welche die direkte Migration in den GI-Trakt unterstützen. LPAM-1 wurde während des gesamten Kulturzeitraumes gleichbleibend auf etwa 20% der Zellen exprimiert. Das Integrin LPAM-1 ($\alpha_4\beta_7$ -Integrin) auf Leukozyten bindet an seinen Liganden MAdCAM-1 (*mucosal addressin cell adhesion molecule 1*) auf mukosalen Endothelzellen und ist verantwortlich für die Migration in darmassoziiertes Lymphgewebe (Peyer'sche Plaques und Lymphfollikel in der LP), insbesondere während Entzündungsprozessen, da MAdCAM-1 unter diesen Bedingungen hoch reguliert wird (262). Entsprechend mindert die Inhibition von LPAM-1 auf T-Zellen durch blockierende Antikörper oder der Einsatz von LPAM-1 knock-out T-Zellen die Entwicklung einer aGVHD des GI-Traktes (262-264). Klinisch wird dieses Prinzip bereits zur Behandlung steroidrefraktärer chronischer Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn genutzt, indem der LPAM-1-blockierende Antikörper Vedolizumab verabreicht wird (265). CCR9 ist der Rezeptor für das Chemokin CCL25 (TECK), welches vor allen Dingen von mukosalen Epithelzellen des Dünndarms gebildet wird (266). CCR9 wurde in der Ausgangspopulation der naiven CD62L⁺ tTreg nur in sehr geringem Maße exprimiert und verlor sich am Ende des Kulturzeitraumes komplett, weshalb eine direkte Migration der *in vitro* expandierten Zellen in den Dünndarm über diesen Signalweg unwahrscheinlich erscheint. CD103, auch als $\alpha_E\beta_7$ -Integrin bezeichnet, vermittelt nicht die Migration, sondern die Retention von Zellen in gastrointestinalem oder generell entzündetem Gewebe. Seine Expression wird durch Aktivierung initialisiert und geht in Treg mit einer erhöhten Expression von Foxp3 und einer erhöhten Suppressionsaktivität einher, wie unter anderem in Modellen der cGVHD oder der allergischen Kontakthypersensitivität beobachtet wurde (267, 268). Dies deckt sich mit den hier erzielten Ergebnissen, die eine signifikante Erhöhung der CD103-Expression in Treg nach Aktivierung und *in vitro* Expansion aufzeigten. Neben dem Migrationsvermögen spielt aber auch der Aktivierungszustand und das damit verbundene Proliferationspotential der Zellen nach Transfer in Empfängertiere eine Rolle, weshalb der Proliferationsmarker Ki-67 bestimmt und auf knapp 30% der Zellen nach *in vitro* Kultur nachgewiesen werden konnte. Zusammen mit der stark erhöhten Expression des hochaffinen IL-2-Rezeptors (CD25) auf *in vitro* expandierten Treg, weist dies auf den aktivierten und weiterhin expansionsfähigen Zustand der Zellen nach Transfer hin. Ob für die erfolgreiche Therapie der aGVHD – ähnlich wie in der Prophylaxesituation - das Homing der Treg in mesenteriale Lymphknoten entscheidend ist oder sie direkt in entzündetes (Darm-) Gewebe einwandern können, ist bisher noch ungeklärt aber Gegenstand weiterführender Untersuchungen der Arbeitsgruppe.

Als Modell für die Treg-Therapie einer etablierten aGVHD wurde ein haploidentes KMT-Modell gewählt, das die Transplantation von BALB/c oder C57BL/6 KM- und Milzzellen in letal bestrahlte CB6F1-Empfängermäuse vorsieht. Dabei führte der Transfer von KM-Zellen alleine zu einer weitgehend symptomfreien Rekonstitution der Tiere aus den im Transplantat enthaltenen Stammzellen (KM-Kontrolltiere). Im Unterschied hierzu führte die Kotransplantation von Milzzellen (GVHD-Tiere) innerhalb einer Woche infolge der Spender-T-Zell-vermittelten Alloreaktion zu klinischen Symptomen der aGVHD mit Gewichts- und Fellverlust, und kyphotischer Körperhaltung. Da die aGVHD vor allem die Immunrekonstitution und die Homöostase im GI-Trakt beeinträchtigt, wurden die betroffenen Kompartimente detailliert untersucht. Im KM von GVHD-Tieren war schon an d7 nach KMT eine starke Infiltration von Spender-T-Zellen zu beobachten, während dies in der Milz vor allem zwischen d11 und d14 nach KMT auftrat, zusammen mit einer signifikanten Infiltration myeloischer Zellen (Daten nicht gezeigt). Bereits vor d11 musste außerdem eine schwere GVHD-assoziierte Entzündungsreaktion in den Lymphknoten stattgefunden haben, da diese zu diesem Zeitpunkt so stark atrophiert waren, dass keine nennenswerten Mengen an Leukozyten mehr isoliert werden konnten. Unabhängig von der Entwicklung einer aGVHD kam es zur Translokation der Erythropoese vom KM in die Milz, die in KM-Kontrolltieren nur transient auftrat, während sie in GVHD-Tieren anhielt.

Neben den lymphatischen Organen stellen Haut, Leber und der GI-Trakt die vorrangigen GVHD-Zielstrukturen dar. Auch in diesen Organen konnten bereits 11 Tage nach GVHD-Induktion histopathologische Veränderungen nachgewiesen werden. So fanden sich im GI-Trakt starke Epithelschäden, Apoptosen und zelluläre Infiltrate, wobei letztere im Dünndarm deutlich geringer ausfielen als im Colon. FACS-Analysen zeigten, dass sich diese Infiltrate in der LP des Colons und des Dünndarms hauptsächlich aus myeloiden Zellen und alloreaktiven Spender T-Zellen zusammensetzten, während sie in den Epithelien nahezu ausschließlich (zu 95-97%) aus Spender T-Zellen bestanden. Hier kam es in Folge der aGVHD auch zu einer vollständigen Depletion von natürlichen und induzierten IEL. Zu den natürlichen IEL zählen die $\gamma\delta$ -T-Zellen sowie $\alpha\beta$ -T-Zellen, die entweder negativ für die beiden Korezeptoren CD4 und CD8 sind (DN T-Zellen), oder ausschließlich das CD8 $\alpha\alpha$ -Homodimer exprimieren (157). CD8 $\alpha\alpha$ ist ein Transmembranmolekül, das intrazelluläre Signalmoleküle der TCR-CD3-Kaskade rekrutieren kann (zum Beispiel LCK und LAT), jedoch nicht mit dem eigentlichen TCR-Komplex in Verbindung steht und daher weder als TCR-Korezeptor fungiert, noch CD4 oder CD8 $\alpha\beta$ ersetzen kann. Deshalb trägt CD8 $\alpha\alpha$ auch nicht zur Aktivierung von T-Zellen bei, sondern reduziert durch die Bindung der an der intrazellulären Signalkaskade beteiligten Moleküle die funktionelle Avidität des MHC-TCR-Komplexes (157). $\gamma\delta$ -T-Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Kontrolle und Reparatur der Epithelzellschicht, indem sie unter anderem durch Sekretion des Keratinozytenwachstumsfaktors Epithelzellwachstum und Turnover

stimulieren (160, 269-272) sowie eine erste Barriere gegen enterische Pathogene bilden (273). Dies konnte eindrücklich in TCR $\gamma\delta$ -defizienten Mäusen gezeigt werden, in denen nach Induktion einer Colitis ein deutlich stärkerer gastrointestinaler Gewebeschaden zu beobachten war (274). Beide Zellpopulationen tragen maßgeblich zur intestinalen Homöostase bei, indem sie beispielsweise exzessive T_H1 und T_H17-Antworten einschränken (163). In den Dick- und Dünndarmepithelien unbehandelter BALB/c- und CB6F1-Tieren machten sie mit etwa 30% $\gamma\delta$ -T-Zellen unter den CD45⁺ Leukozyten und bis zu 80% CD8 $\alpha\alpha$ ⁺ unter Gesamt-CD8 $\alpha\alpha$ ⁺ $\alpha\beta$ -T-Zellen einen relevanten Anteil der IEL aus. Als induzierte IEL bezeichnet man die CD8⁺ (oder CD4⁺) $\alpha\beta$ -T-Zellen, die das CD8 $\alpha\alpha$ -Homodimer als Reaktion auf die Erkennung ihres spezifischen Antigens hoch regulieren. Das Expressionslevel ist hierbei proportional zur Stärke der TCR-Aktivierung, weshalb es auch als typischer Aktivierungsmarker gilt (275).

Als Folge der aGVHD wurde ein fast vollständiger Verlust von Paneth-Zellen im Dünndarm beobachtet. Paneth-Zellen sind an der Nischenbildung für intestinale Stammzellen beteiligt und ihr Verlust beeinträchtigt über die verminderte Stammzellaktivität die Epithelreparatur (276). Darüber hinaus verfügen sie über breit gefächerte antimikrobielle Eigenschaften, z.B. durch die Sekretion von α -Defensinen und Lysozym, wodurch Bakterien in epithelnahen Schichten lysiert werden indem ihre Zellwand durch Porenbildung oder enzymatische Hydrolyse zerstört wird (277-279). Durch den Verlust dieser Paneth-Zell-Funktion wird das Mikrobiom nachhaltig gestört, sodass pathogene Keime nicht mehr effektiv bekämpft werden. In Abhängigkeit vom GVHD-Schweregrad siedeln sich deshalb zunehmend *Lactobacillae* und *Enterobacteriales* im GI-Trakt an, die die kommensalen Bakterien verdrängen (170, 171, 178). Eine Korrelation zwischen Paneth-Zell-Schaden und erhöhtem Schweregrad der aGVHD konnte bereits in mehreren experimentellen (170-172), aber auch in klinischen Studien (173) bestätigt werden. Der massive Influx pro-inflammatorischer Leukozyten bei gleichzeitigem Verlust regulatorischer und regenerativer Zellpopulationen führt im Zusammenspiel mit der verminderten Treg-Frequenz in allen Kompartimenten (280, 281) zu einer schwerwiegenden immunologischen Dysregulation im GI-Trakt und dadurch zu einer sich selbst treibenden Inflammation, wie anhand der stark erhöhten Spiegel für pro-inflammatorische Chemokine und Zytokine, z.B. für CXCL2 und IFN- γ , bestätigt werden konnte. Das Ausmaß der Inflammation war dabei im Colon deutlich stärker ausgeprägt als im Dünndarm.

In dem hier verwendeten Modell zeigten CB6F1-Empfängertiere bereits an d11 nach haplo-identer KMT klinische und histologische Anzeichen einer schweren aGVHD, weshalb dieser Tag für die adoptive Therapie mit *in vitro* expandierten Treg-Zellen gewählt wurde. Diese führte in den behandelten GVHD-Tieren langfristig zu einer Verbesserung sowohl des GVHD-induzierten Gewichtsverlusts, als auch der klinischen Symptomatik, so dass eine Überlebensrate von 66,67% erreicht und damit die Mehrzahl der Tiere vor der ansonsten letal verlaufenden aGVHD gerettet werden konnte. Wie im Ergebnisteil beschrieben und oben

bereits diskutiert, wiesen die *in vitro* expandierten Treg-Zellen ein gemischtes Expressionsprofil bezüglich unterschiedlicher Migrationsmarker auf, welches ihnen eine Migration in die Lymphknoten und andere sekundäre lymphatische Organe ebenso ermöglichen würde wie in entzündete nicht-lymphatische Gewebe. Um nun das tatsächliche Migrationsverhalten therapeutisch verabreichter Treg *in vivo* nachverfolgen zu können, wurden Zellen aus BALB/c Thy1.1⁺ Mäusen eingesetzt, die auf Grund ihres kongenen Markers von den ursprünglich transplantierten oder *in vivo* rekonstituierten Spender-Treg-Zellen unterschieden werden konnten. Bereits 7d nach Gabe konnte in KM und Milz ein starker Anstieg der initial sehr niedrigen Treg-Zahlen beobachtet werden, was nahezu ausschließlich auf eine Einwanderung der therapeutisch applizierten Treg zurückzuführen war. Der mengenmäßig größte Anteil der Zellen war im Darm wiederzufinden und führte dort kurzfristig zu einer etwa 10-fach erhöhten absoluten Treg-Zahl. Nguyen et al. (202) analysierten in einem MHC-differenten KMT-Modell das Migrationsverhalten von CD4⁺ Tkonv und Treg bei der GVHD-Prophylaxe. Sie nutzten dabei das *in vivo* Biolumineszenzverfahren (BLI), das die Verfolgung von Zellen im lebenden Tier und in Echtzeit ermöglicht (282) und konnten so zeigen, dass sowohl Tkonv als auch Treg innerhalb von 2-3d nach Transfer in die Milz und die peripheren und gastrointestinalen Lymphknoten einwanderten, wo sie ihr initiales Priming erfuhren und anschließend proliferierten. Ab d4 nach KMT verließen Treg die lymphatischen Organe und wanderten vermehrt in den GI-Trakt ein, wo – ähnlich wie hier in der GVHD-Therapie – maximale Werte an d8 erreicht wurden. Ob die Treg-Zellen im hier getesteten therapeutischen Ansatz direkt, etwa mittels LPAM-1, in den Darm migrierten oder, wie in der Prophylaxesituation, zuvor in den Lymphknoten wanderten, kann anhand der vorliegenden Daten nicht abschließend beurteilt werden, da die frühe Treg-Migration im therapeutischen Modell nicht engmaschig genug untersucht wurde. Erstaunlich war allerdings die Stabilität der transferierten Treg-Zellen. In der Literatur grassieren wiederholt Befürchtungen, dass Treg unter inflammatorischen Bedingungen instabil sind und ihre Foxp3-Expression sowie suppressive Aktivität verlieren (207, 208). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen hingegen, dass die eingesetzten CD62L⁺ Treg nicht nur während der *in vitro* Expansionsphase stabil blieben, sondern auch *in vivo* nach Transfer in CB6F1-Mäuse mit aGVHD, wo sie selbst nach drei Monaten homogen Foxp3 exprimierten. In der Frühphase nach GVHD-Therapie führten die adoptiv transferierten Treg-Zellen zu einer quantitativen Erhöhung des Treg-Pools, der sich zum Versuchsende in KM und GI-Trakt auf ein normales Niveau einpendelte. In der Milz blieben Treg-Zellen quantitativ vermindert, was insbesondere auf die verminderte Gesamtzellularität dieses fibrosierten Organs zurückzuführen war. Immerhin ließen sich sogar nach mehr als drei Monaten in allen untersuchten Organen noch Nachfahren der therapeutisch applizierten Treg nachweisen, was eindrücklich die Langlebigkeit der Treg selbst nach extensiver *in vitro* Expansion belegt. Zu diesem Zeitpunkt verteilten sich die therapeutischen Spender-Treg

mengenmäßig gleichmäßig auf Milz, KM und GI-Trakt, prozentual waren sie mit über 20% im KM aber noch auffallend hoch. Da Treg zum Schutz der Stammzellnische im KM beitragen (283), könnte ihre anhaltende Präsenz auf eine aktive Rolle in der Suppression von Alloreaktionen in diesem Kompartiment hinweisen. Die Klärung solcher Fragestellungen ist Thema separater Forschungsprojekte der Arbeitsgruppe.

Um die Wirkung der Treg-Therapie auf die GVHD-induzierte Suppression der Immunrekonstitution in den primären und sekundären lymphatischen Organen näher zu untersuchen, wurden KM und Milz engmaschig untersucht. Die durch die Konditionierung induzierte Leukozytopenie normalisierte sich in KM-Kontrolltieren ohne aGVHD spätestens nach 3-4 Wochen. Trotzdem waren in diesen Tieren im Vergleich zu nicht-transplantierten CB6F1-Tieren über den gesamten Versuchszeitraum hinweg deutlich erhöhte Mengen an Stamm- und leukozytären Vorläuferzellen im KM zu finden, was auf andauernde Regenerationsprozesse hindeutet. In GVHD-Tieren kam es initial (an d11 nach KMT) ebenfalls zu einer signifikanten Steigerung der Stammzellzahlen im KM, diese war allerdings nur transienter Natur und übertrug sich nicht in eine Steigerung der Lymphopoese, da lymphozytäre Vorläufer (CLP1 und CLP2) in 10-100-fach verminderter Zahl im Vergleich zu KM-Kontrolltieren vorlagen. Diese Beobachtung deckt sich mit veröffentlichten Daten von Shono et al. (236) sowie mit unveröffentlichten Daten aus der eigenen Arbeitsgruppe (Kristina Doser et al., Manuskript in Vorbereitung), in denen nachgewiesen wird, dass die aGVHD die B-Zell-Rekonstitution inhibiert (236, 237) und bis d40 nach KMT zu einem nahezu vollständigen Verlust der T- und B-Zellpopulationen, im weiteren Verlauf aber auch zum Rückgang der Myelopoese führt. In der Milz von GVHD-Tieren war bereits ab d18 nach KMT ein fortschreitender Verlust der Zellularität zu beobachten, die an d40 nur noch bei knapp 4% des Normalwertes in nicht-transplantierten Tieren lag. Auch hier war vorwiegend das B-Zell-kompartiment betroffen, aber auch die T-Zellen, so dass in GVHD-Tieren die residuellen Zellen zu 66% aus myeloischen Zellen und zu 20% aus erythropoetischen Vorläufern bestanden. Innerhalb der T-Zellen kam es im Verlauf der aGVHD zu einer deutlichen Verschiebung der CD4/CD8 Ratio zugunsten von CD8⁺ T-Zellen, ein Indiz für die beeinträchtigte Thymusfunktion bei zugleich peripherer Expansion reifer, allospezifischer Spender-CTL. Leider konnten die Auswirkungen der aGVHD auf den Thymus im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden, da der Thymus zu den Untersuchungszeitpunkten schon zerstört war und keine Zellen isoliert werden konnten. Insbesondere die Arbeitsgruppe um Georg Holländer hat allerdings nachgewiesen, dass die Zerstörung von Thymusepithelzellen durch alloreaktive Spender-T-Zellen die T-Zellregeneration nachhaltig beeinträchtigt (284, 285). Zusammenfassend zeigte sich im hier untersuchten haploidenten KMT Modell, dass sowohl primäre als auch sekundäre Lymphorgane Zielstrukturen der aGVHD sind, was zur Dysplasie der Milz und Dysfunktion des

lymphatischen Systems führt, wie auch von anderen Gruppen für ähnliche GVHD-Modelle beschrieben (224, 236, 238).

Die Therapie von GVHD-Tieren mit *in vitro* expandierten Spender-Treg-Zellen an d11 nach KMT zeigte deutliche Wirkungen auf die lympho-/hämatopoetischen GVHD-Schädigungen. So konnten die schweren Gewebeschäden in lymphatischen Organen sowie die massive Beeinträchtigung der Hämatopoese an d40 nach KMT verhindert werden. Bis d100 kam es zu einer kompletten Rekonstitution des Pools an pluripotenten Stamm- und lymphozytären Vorläuferzellen im KM, so dass deren Zellzahlen am Versuchsende auf dem Niveau der KM-Kontrolltiere lagen. Insofern wurde das GVHD-induzierte KM-Versagen durch die Treg-Therapie gestoppt, was sich auch an der Normalisierung der Gesamtzellularität sowie anderer hämatopoetischer Zellsubpopulationen im KM ablesen ließ. Die funktionelle Relevanz der Treg-Therapie zeigte sich insbesondere am B-Zell-Kompartiment, da es zwischen d40 und d100 zu einer fast vollständigen B-Zell-Rekonstitution kam, was auf die Regeneration der B-Zell-Nische einschließlich der daran beteiligten Stromazellen im KM hinweist (286). Bei der B-Zellreifung im KM entsteht aus den B-Zell-restringierten lymphoiden Vorläuferzellen (CLP 2) über die Prä-Pro-B-Zelle (Hardy Fraktion A), in der die D-J-Umlagerung der schweren Kette des B-Zell-Rezeptors stattfindet, die Pro-B-Zelle (Hardy Fraktion B), in welcher die schwere Kette des B-Zell-Rezeptors V-DJ-umgelagert wird und die Zelle zusätzlich MHC-Klasse II exprimiert. Danach kommt es im Stadium der großen Prä-B-Zelle (Hardy Fraktion C) nach Assoziation der schweren mit der Surrogat-leichten-Kette ($\lambda 5$) zur Expression des sogenannten Prä-B-Zell-Rezeptors, während in den kleinen Prä-B-Zellen (Hardy Fraktion D) die spezifische leichte Kette mittels V-J-Umlagerung entsteht, die dann in den unreifen B-Zellen (Hardy Fraktion E) zusammen mit der schweren Kette den eigentlichen B-Zellrezeptor bildet. In diesem Entwicklungszustand verlassen die B-Zellen das KM und wandern in die Milz, wo sie ihre Entwicklung in naive, rezirkulierende, IgM und IgD exprimierende B-Zellen (Hardy Fraktion F), Marginalzonen- oder follikuläre B-Zellen abschließen (287). Eine detaillierte Analyse der B-Zellen in KM und Milz von GVHD-Tieren zeigte, dass sich die gesamte Entwicklungsreihe der B-Zellen nach Treg-Therapie gleichmäßig erholte und an d100 nach KMT in der prozentualen Verteilung der einzelnen Fraktionen keine Unterschiede mehr zwischen Therapie-Tieren und nicht-transplantierten CB6F1-Mäusen zu erkennen waren. In den KM-Kontrolltieren war dagegen auch zu diesem Zeitpunkt noch eine signifikant höhere Anzahl an kleinen Prä-B-Zellen vorhanden, was zusammen mit den ebenfalls bis d100 immer noch erhöhten Gesamt-B-Zellzahlen für eine überschießende Rekonstitution des B-Zell-Pools in diesen Tieren spricht.

Im Unterschied zum Knochenmark war die Schädigung der Milz nach einmaliger Treg-Therapie nicht vollständig reversibel, so dass ab d40 zwar der zunehmende Verlust der Zellularität gestoppt werden konnte, eine vollständige Erholung der Zellularität bis d100 aber

nicht beobachtet wurde. Allerdings normalisierte sich die lymphozytäre Zusammensetzung der Milz (Abnahme myeloischer Zellen und Zunahme von B-Zellen), so dass eine Restfunktion der Milz in Treg-behandelten GVHD-Tieren vermutet wird. Diese funktionelle Aktivität muss in zukünftigen Studien aber noch zweifelsfrei bewiesen werden, z.B. durch Vakzinationsexperimente. Zusammenfassend zeigte der Treg-Transfer bei bestehender aGVHD eine deutliche therapeutische Wirkung auf die Lympho-/Hämatopoese, da die Inflammation (ähnlich wie in der Prophylaxesituation) in primären und sekundären lymphatischen Organen reduziert und dadurch die Immunrekonstitution verbessert wurde [(242) und Kristina Doser, unveröffentlichte Daten]. Insbesondere die B-Zell-Rekonstitution wurde durch die aGVHD massiv gestört, weshalb B-Zellen eventuell als Biomarker für GVHD-induzierte Schädigungen genutzt werden könnten. Um dies zu überprüfen wurden Therapie-Tiere retrospektiv in ‚Responder‘ und ‚Non-Responder‘ eingeteilt und an d21 nach KMT auf ihren B-Zellgehalt im peripheren Blut untersucht. Hier zeigte sich, dass ‚Responder‘ zu diesem frühen Zeitpunkt bereits eine um den Faktor 5 stärkere B-Zell-Rekonstitution aufwiesen als finale ‚Non-Responder‘. Diese Biomarker-Hypothese wird derzeit im Rahmen von Immunmonitoringstudien bei Transplantationspatienten am Universitätsklinikum Regensburg überprüft.

Therapeutisch applizierte Treg wanderten früh nach Transfer präferentiell in den GI-Trakt ein, in dem zum Zeitpunkt der Therapie schon eine massive Inflammation nachgewiesen wurde. Im Dünndarm beruhte diese anfänglich nur auf einer veränderten zellulären Zusammensetzung der Leukozyten in der Lamina propria und im Epithel (siehe Abschnitt 4.3.2), ab d18 wurde zusätzlich ein massiver Influx von $\alpha\beta$ -T-Zellen des Spenders sowie myeloischer Zellen beobachtet. Bis d40 nach KMT, dem letzten Analysetag für GVHD-Tiere, blieb eine Regeneration der natürlichen IEL aus und auch die stark dezimierten Paneth-Zellzahlen nahmen nur passager wieder zu, bevor sie an d40 komplett einbrachen. Durch die therapeutische Gabe von Spender-Treg wurde dieser massive Influx von Spender-Tkonv-Zellen in die Lamina propria und das Epithel verhindert. Parallel zeigte sich an d40 nach KMT bereits eine partielle und an d100 schließlich eine vollständige Regeneration der epithelialen $\gamma\delta$ -T-Zellen, ein weiteres Indiz für die Normalisierung der Immunhomöostase des Dünndarms (271). Auch die Zellularität und Zellzusammensetzung der Lamina propria des Dünndarms besserten sich nach Treg-Therapie und insbesondere die Normalisierung der Paneth-Zellen bis d40 illustrierte die Treg-induzierte Geweberegeneration. Zusammen mit der zu diesem Zeitpunkt deutlich erhöhten Reg3 γ -Expression, die der von KM-Kontrolltieren zwischen d11 und d18 entsprach, deutet dies auf eine verzögerte aber anhaltende Regeneration des Dünndarmkompartiments hin, was vermutlich auch zur Normalisierung des Mikrobioms beiträgt (171).

Ähnliche Effekte wurden auch im Colon beobachtet, wo zum Zeitpunkt der Treg-Therapie bereits ein deutliches Leukozyteninfiltrat vorlag, dass in unbehandelten GVHD-Tieren noch weiter anstieg und an d40 mit über 5×10^6 Zellen seinen Maximalwert erreichte. Im Epithel nahm die Zellzahl dagegen ab d11 stetig ab, was zusammen mit dem Verlust von $\gamma\delta$ -T-Zellen als Zeichen der zunehmenden Disruption der Epithelstruktur gewertet wurde mit dem damit einhergehenden Verlust der Barrierefunktion (182). Die Epithelzellinfiltrate bestanden wie im Dünndarm fast ausschließlich aus Spender-T-Zellen, während in die LP zusätzlich myeloische Zellen einwanderten. Der zunehmende Influx von Immunzellen in die LP führte auch im Vergleich zu d11 noch einmal zu einer deutlichen Aggravation der Inflammation, wie anhand der 700-fach erhöhten Expression des Neutrophilen-anlockenden Chemokins CXCL2 und der bis zu 80-fachen Erhöhung von IFN- γ abzulesen war. Im Vergleich zu unbehandelten Tieren wurde der zelluläre Influx in die cLP nach Treg-Therapie unterbunden, was sich insbesondere an der reduzierten Anzahl an Neutrophilen zeigte, deren Infiltration als Indikator für den GVHD-Schweregrad gewertet wird (288). Diese Effekte, zusammen mit der nachgewiesenen Reduktion der inflammatorischen Zytokine IFN- γ und TNF, sprechen für eine Eindämmung der GVHD-induzierten Inflammation durch die applizierten Treg-Zellen ab d40 nach KMT. Gleichzeitig ließ sich eine Reduktion der Proliferation von Tkonv im Colon nachweisen, was zu einer erhöhten Treg/Tkonv-Ratio führte. Ähnliche Effekte wurden auch von Fiona Powrie und Kollegen nach Treg-Therapie im Modell der Transfercolitis beobachtet (289), bei der transferierte syngene Treg-Zellen ebenfalls sowohl in die Darm-assoziierten sekundären Lymphorgane als auch die entzündete LP des Colons einwanderten und dort das T-Zellinfiltrat reduzierten und die Inflammation stoppten. Interessanterweise benötigten Treg-Zellen auch in der Transfercolitis mehrere Wochen für die vollständige Wiederherstellung der Darmhomöostase (289, 290). Sowohl in der Colitis als auch in der GVHD minderten therapeutisch applizierte Treg die Inflammation, indem sie die Proliferation und Anzahl an Tkonv reduzierten. Zusätzlich werden aber auch direkte und/oder indirekte Treg-Effekte (z.B. über $\gamma\delta$ -T-Zellen oder die epitheliale Stammzellnische) vermutet, die die Regeneration des Colonepithels über die Eindämmung der Inflammation hinaus unterstützen (291).

Einige Gewebeschäden im GI-Trakt blieben trotz Treg-Therapie bis d100 nach haploidenter KMT bestehen. So war das Colon auch in erfolgreich therapierten GVHD-Tieren im Vergleich zu KM-Kontrolltieren durch die langanhaltende Inflammation verkürzt und die Tiere zeigten noch immer einen leicht erhöhten histologischen Score, obwohl er sich im Vergleich zu d40 nach KMT bereits signifikant verbessert hatte. Gleichzeitig blieb die Anzahl an CD8⁺ Tkonv im Epithel erhöht, deren inflammatorische Wirkung jedoch durch die ebenfalls erhöhte Anzahl an Treg kontrolliert werden konnte, wie die normalisierten Spiegel an inflammatorischen Zytokinen deutlich machten. Aufgrund der residuellen Gewebeveränderungen stellte sich die Frage, ob die Treg-Wirkung nicht noch weiter verbessert werden könnte. Bei den Migrations-

untersuchungen war auffällig gewesen, dass es nach dem starken Anstieg der Treg-Zahlen am d7 nach Transfer innerhalb der darauffolgenden 7 Tage zu einem Abfall in fast allen Organen kam. Da dieser Zeitraum mit der Effektorphase der aGVHD zusammen fiel und die Treg-Spiegel zu diesem Zeitpunkt für die Effektivität einer Treg-Therapie relevant sein könnten, wurden weiterführende Experimente durchgeführt, in denen zusätzlich zur Gabe an d11 eine zweite Treg-Therapie an d18 durchgeführt wurde. Obwohl in diesem Set an Experimenten die Effektivität der einfachen Treg-Therapie mit einer Überlebensrate von 78,95% höher war als in den vorangegangenen Experimenten, konnte sie durch die zweifache Therapie weiter auf 84,21% gesteigert werden. Wurden Treg nur an d18 gegeben, so sank die Überlebensrate auf 60,0%, wodurch deutlich wird, dass der Überlebensvorteil der zweifach therapierten Tiere nicht auf den Therapiezeitpunkt zurückzuführen ist, sondern auf deren wiederholte Applikation. Die doppelte Treg-Gabe bewirkte darüber hinaus eine Senkung des maximalen Schweregrades der aGVHD von $4,03 \pm 0,38$ auf $3,10 \pm 0,25$ im kritischen Zeitraum der Krankheit (d20 bis d40 nach KMT) und zur Verringerung der krankheitsbedingten Gewebeschädigungen. Dies zeigte sich unter anderem an der im Vergleich zu einmalig behandelten Tieren erhöhten Zellularität der Milz an d100 nach KMT, wohingegen Tiere, die ausschließlich an d18 nach KMT Treg-Zellen erhalten hatten, eine signifikant niedrigere Milzzellzahl aufwiesen (Daten nicht gezeigt). Auch die B-Zell-Rekonstitution in der Milz war in zweifach therapierten Tieren signifikant besser als nach einmaliger Treg-Gabe, was sich vor allen Dingen in einer größeren Anzahl an follikulären B-Zellen niederschlug. Neben der Verbesserung der Milzstruktur fielen aber auch die Schädigungen des Colons deutlich geringer aus, so dass sich sowohl die Colonlänge als auch der histologische Score im Dickdarm dem in transplantierten Tieren ohne aGVHD annäherte. Zusammenfassend sprechen diese Ergebnisse dafür, dass durch eine wiederholte Gabe *in vitro* expandierter Spender-Treg deren therapeutische Wirkung in der GVHD-Effektorphase noch gesteigert werden kann, da die Alloreaktion in lymphatischen und gastrointestinalen Geweben effektiver unterdrückt, die Immunrekonstitution weiter verbessert und schwere, irreversible Gewebeschäden effektiver verhindert werden.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Die allogene HSZT ist eine kurative Therapieoption für mehrere maligne und einige nicht-maligne Erkrankungen der Hämatopoese, birgt jedoch das Risiko einer schweren Transplantationskomplikation, der Entwicklung einer aGVHD. In murinen Modellen der allogenen HSZT konnte gezeigt werden, dass die Kotransplantation angereicherter Spender-Treg-Zellen vor letaler aGVHD schützt ohne die GVL-Aktivität von konventionellen Spender-T-Zellen komplett zu inhibieren. Für den Schutz vor aGVHD war eine effiziente Migration der Treg-Zellen in die Lymphknoten erforderlich, wodurch die frühe Expansion alloreaktiver T-Zellen effizient verhindert wurde. Erste klinische Studien bestätigen mittlerweile die Wirksamkeit des Treg-Transfers zur Vermeidung der aGVHD nach haploidenter HSZT. Es war deshalb naheliegend, im nächsten Schritt die therapeutische Wirksamkeit von Spender-Treg in präklinischen Modellen zu überprüfen, was zentrale Fragestellung der vorliegenden Promotionsarbeit war. Da humane wie murine Treg-Zellen nur in geringer Frequenz im peripheren Blut vorliegen, ist für potentielle therapeutische Anwendungen deren *in vitro* Expansion erforderlich. Um dieses Szenario kliniknah zu simulieren, wurden *in vitro* Expansionsprotokolle für murine Treg-Zellen etabliert. Dabei konnten frühere Berichte bestätigt werden, wonach lediglich die Population der CD4⁺CD25⁺CD62L⁺ T-Zellen ein adäquates Ausgangsmaterial für die Gewinnung eines reinen Treg-Produktes darstellt, da diese, anders als die CD62L⁻ Subpopulation, zu nahezu 100% den linienspezifischen Transkriptionsfaktor Foxp3 exprimiert und diese Expression nach 14-tägiger *in vitro* Kultur mit fast 100-facher Expansion stabil aufrechterhielt. Im Unterschied zur CD4⁺CD25⁺CD62L⁻ Treg-Subpopulation, die von kontaminierenden Tkonv-Zellen überwachsen wurde, behielt die CD62L⁺ Startpopulation nicht nur ihren Phänotyp (einschließlich der tTreg-assoziierten Marker Neuropilin und Helios), sondern auch ihre suppressive Aktivität.

Zur Untersuchung der therapeutischen Wirksamkeit solcher Treg-Produkte wurden haploidente KMT-Modelle etabliert (hauptsächlich BALB/c → CB6F1, zu Konfirmationszwecken auch C57BL/6 → CB6F1) und in detaillierten Experimenten nachgewiesen, dass bereits an d11 nach KMT sämtliche klinischen, histologischen und zellulären Zeichen einer schweren aGVHD mit Darmbeteiligung vorlagen. In GVHD-Tieren, die an d11 nach KMT *in vitro* expandierte Spender-Treg-Zellen appliziert bekamen, verbesserte sich die klinische Symptomatik und damit der Schweregrad der aGVHD und über 65% der Tiere konnten vor der ansonsten letal verlaufenden aGVHD gerettet werden. Die therapeutisch verabreichten Treg (und/oder ihre Nachkommen) waren langfristig in den Tieren nachweisbar und behielten über den dreimonatigen Untersuchungszeitraum homogen ihre Foxp3-Expression, was ihre Linienstabilität bestätigte. Im Rahmen der Analyse der Treg-Wirkmechanismen wurde nachgewiesen, dass die Zellen den Influx und die Proliferation von konventionellen T-Zellen

im GI-Trakt inhibieren, die Treg/Tkonv-Ratio anheben, den Einstrom von Granulozyten reduzieren und die Sekretion von inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen supprimieren. In der Summe führten diese Mechanismen zur Regeneration des Darmepithels, was mittels histologischer Untersuchungen bestätigt wurde und eindrücklich an der Rekonstitution von Paneth-Zellen ersichtlich war, die im Rahmen der aGVHD komplett zerstört wurden. Der Nachweis von Lysozym in diesen Zellen sowie die erhöhten Reg3γ-Spiegel belegten die funktionelle Integrität der regenerierten Paneth-Zellen, was sich vermutlich auch positiv auf die GVHD-induzierten Mikrobiomveränderungen auswirkte, die in dieser Arbeit allerdings nicht weiter untersucht wurden. Auch in der Haut ließ sich die therapeutische Wirkung der Spender-Treg nachweisen, da sich die histologischen Veränderungen zurückbildeten und Treg-behandelte Tiere erneutes Fellwachstum in GVHD-induzierten Alopieziearealen zeigten. In Analysen zur lympho-/hämatopoetischen Regeneration nach KMT zeigte sich darüber hinaus, dass die Treg-Therapie die Regeneration der Lymphopoese (am besten ersichtlich anhand der B-Zell-Regeneration) fördert und das GVHD-induzierte KM-Versagen verhindert. Alleine die frühe Schädigung und Fibrosierung von Milz und Lymphknoten konnten durch die einmalige Gabe von Spender-Treg an d11 nicht vollständig verhindert bzw. revidiert werden. Hier konnte durch die wiederholte Gabe von therapeutischen Treg in einem Abstand von 7d jedoch noch eine signifikante Steigerung der Effektivität erreicht werden. Die dadurch erzielte Stärkung des therapeutischen Treg-Pools während der Effektorphase der aGVHD führte zu einer Senkung des maximalen GVHD-Schweregrades und der damit einhergehenden Organschädigung, wodurch die Protektion sowohl der lymphatischen als auch der gastrointestinalen Gewebe erhöht, die nachfolgende Immunrekonstitution und Geweberegeneration verbessert und in der Folge auch die Überlebensrate der Tiere weiter gesteigert werden konnte. Zusammen mit präliminären Ergebnissen einer laufenden klinischen Studie zur Treg-Therapie bei steroidrefraktärer aGVHD (Studienleiter M. Edinger) sprechen die Ergebnisse dieser Arbeit eindeutig für eine Wirksamkeit von Spender-Treg-Zellen in der Therapie der aGVHD. Diese Daten könnten zu einem Umdenken in der GVHD-Therapie beitragen, da sie belegen, dass die bisherige Fokussierung auf unselektive pharmakologische Immunsuppressiva die offensichtlich notwendige Regeneration peripherer Toleranzmechanismen unzureichend berücksichtigt.

Da der GI-Trakt ein wesentliches Zielorgan der aGVHD ist und die schnelle und gerichtete Migration therapeutisch applizierter Treg sowie ihre lokale Aktivierung und Expansion im GI-Trakt für den Therapieerfolg vermutlich relevanter sind, werden in zukünftigen Versuchen diese Aspekte näher adressiert werden. Durch Modulation der Expression entsprechender Migrationsmoleküle (z.B. GPR-15 für das Colon oder CCR9 für den Dünndarm) soll überprüft werden, ob eine verbesserte Migration therapeutisch verabreichter Treg-Zellen in den GI-Trakt ihre therapeutische Wirkung verstärkt. Hierfür sollen Spender-Treg z.B. durch Elektroporation

entsprechender mRNA am Tag der Therapie modifiziert werden oder die Expression der Migrationsfaktoren durch Änderung der Kulturbedingungen, z.B. durch den Zusatz von all-trans-Retinsäure (ATRA), induziert werden. Da Treg-Zellen ihre suppressive Aktivität erst nach Stimulation über ihren TCR entwickeln, hängt ihre therapeutische Effizienz auch von der lokalen Aktivierung und Expansion in den Zielgeweben ab. Eine Bestimmung des TCR-Repertoires der therapeutischen Treg in verschiedenen Zielorganen der aGVHD könnte zum Nachweis spezifischer Klonotypen für unterschiedliche Gewebe führen, die als Reaktion auf gewebespezifische Antigene präferentiell expandieren. Nach Identifizierung und Isolierung der entsprechenden TCRs und Einbringung in polyklonale Treg müsste dann überprüft werden, ob die TCR-transduzierten Treg-Zellen tatsächlich eine verbesserte therapeutische Effizienz aufweisen. Sollte dies gelingen, wären auch CAR-modifizierte Treg-Zellen zur Therapie der aGVHD mittelfristig eine Option.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Stadien der Hämatopoese, modifiziert nach Lai und Kondo (1)	7
Abb. 1.2: Zentrale Toleranz im Thymus, modifiziert nach Passos et al. (17)	10
Abb. 1.3: Entstehung der aGVHD nach allogener KMT. Modifiziert nach Hill und Ferrara (114)	22
Abb. 1.4: Immunologische Homöostase im GI-Trakt. Aus Sun et al. (156)	24
Abb. 4.1: Magnetbasierte Zellanreicherung von murinen CD25-exprimierenden Zellen aus der Milz	58
Abb. 4.2: FACS-basierte Sortierung von CD62L ⁺ und CD62L ⁻ Treg- sowie CD4 ⁺ CD25 ⁻ Tkonv-Zellen	59
Abb. 4.3: Kulturbedingungen für die <i>in vitro</i> Expansion regulatorischer T-Zellen	60
Abb. 4.4: Expansionsrate und Foxp3-Expression von CD62L ⁺ und CD62L ⁻ Treg-Zellen nach 14-tägiger <i>in vitro</i> Expansion	61
Abb. 4.5: Foxp3- bzw. GFP-Expression von BALB/c und Foxp3 ^{GFP} Treg und Tkonv nach <i>in vitro</i> Expansion	61
Abb. 4.6: Suppressiva Kapazität der <i>in vitro</i> expandierten im Vergleich zu frisch isolierten CD62L ⁺ Treg	62
Abb. 4.7: Zytokinprofil frisch isolierter und <i>in vitro</i> expandierter Treg- und Tkonv-Zellen	64
Abb. 4.8: Phänotypische Charakterisierung <i>in vitro</i> expandierter CD62L ⁺ Treg	65
Abb. 4.9: Proliferation <i>in vitro</i> expandierter CD62L ⁺ Treg	66
Abb. 4.10: Schema der Isolation von Leukozyten aus gastrointestinalem Gewebe	67
Abb. 4.11: Isolation von Leukozyten aus LP und Epithel des Colons und Dünndarmes	69
Abb. 4.12: Zusammensetzung der Leukozytenpopulationen aus dem GI-Trakt unbehandelter Spender- und Empfängermause	70
Abb. 4.13: Zusammensetzung der αβ-T-Zellpopulation im GI-Trakt	71
Abb. 4.14: Treg-Subpopulationen unter CD4 ⁺ αβ-T-Zellen im GI-Trakt	72
Abb. 4.15: Zusammensetzung der intraepithelialen CD8α ⁺ αβ-T-Zellen im GI-Trakt	72
Abb. 4.16: Mausmodell der haploidenten Knochenmarktransplantation (BALB/c → CB6F1)	73
Abb. 4.17: Körpergewicht und klinischer GVHD-Score nach haploidenter KMT	74
Abb. 4.18: T-Zellzahl in KM und Milz nach haploidenter KMT	74
Abb. 4.19: Histopathologische Analyse von Mäusen mit bzw. ohne GVHD an d11 nach haploidenter KMT	76
Abb. 4.20: Leukozytengehalt in verschiedenen GI-Kompartimenten an d11 nach KMT	76
Abb. 4.21: Zusammensetzung der Leukozytenpopulationen aus dem GI-Trakt von KM-Kontroll- und GVHD-Tieren an d11 nach haploidenter KMT	77

Abb. 4.22: Zusammensetzung der intestinalen $\alpha\beta$ -T-Zellpopulation von KM-Kontroll- und GVHD-Tieren an d11 nach haploidenter KMT	78
Abb. 4.23: Zusammensetzung der intestinalen, epithelialen CD8 α^+ $\alpha\beta$ -T-Zellpopulation von KM-Kontroll- und GVHD-Tieren an d11 nach haploidenter KMT	79
Abb. 4.24: mRNA-Spiegel verschiedener Chemokine und Zytokine im Colon von KM-Kontroll- und GVHD-Tieren an d11 nach haploidenter KMT	79
Abb. 4.25: mRNA-Spiegel verschiedener Chemokine und Zytokine im Dünndarm von KM-Kontroll- und GVHD-Tieren an d11 nach haploidenter KMT	80
Abb. 4.26: Paneth-Zellen und Reg3 γ mRNA-Spiegel im Dünndarm von KM-Kontroll- und GVHD-Tieren an d11 nach haploidenter KMT	81
Abb. 4.27: Treg Frequenz unter CD4 $^+$ T-Zellen in verschiedenen Organen an d11 nach KMT	81
Abb. 4.28: Schema der Therapie einer etablierten aGVHD mit <i>in vitro</i> expandierten Spender Treg-Zellen.....	82
Abb. 4.29: Gewicht, klinischer GVHD Score und Überleben nach haploidenter KMT und Treg-Therapie	83
Abb. 4.30: Histopathologische Analyse nach Treg-Therapie in Mäusen mit aGVHD	84
Abb. 4.31: Überleben, Gewicht und klinischer GVHD Score von ‚Respondern‘ vs ‚Non-Respondern‘ der Treg-Therapie	85
Abb. 4.32: Klinische Symptomatik von ‚Respondern‘ und ‚Non-Respondern‘ der Treg-Therapie an d11 nach KMT	86
Abb. 4.33: Migration und Persistenz <i>in vitro</i> expandierter Treg nach therapeutischer Applikation in CB6F1-Mäuse mit aGVHD	87
Abb. 4.34: Organverteilung der therapeutisch applizierten Treg	88
Abb. 4.35: Treg-Frequenz unter CD4 $^+$ T-Zellen nach haploidenter KMT und Treg-Therapie.....	88
Abb. 4.36: Stabilität therapeutischer Treg in KMT-Rezipienten mit aGVHD	89
Abb. 4.37: Leukozytengehalt von KM und Milz nach haploidenter KMT und Treg-Therapie.....	90
Abb. 4.38: Zelluläre Zusammensetzung der Leukozyten aus KM und Milz nach haploidenter KMT und Treg-Therapie	92
Abb. 4.39: Prozentuale Zusammensetzung der Leukozyten aus KM und Milz nach haploidenter KMT und Treg-Therapie.....	92
Abb. 4.40: Leukozytäre Vorläufer im KM nach Treg-Therapie	94
Abb. 4.41: B-Zell-Fraktionen im KM an d100 nach KMT	95
Abb. 4.42: B-Zell-Fraktionen in der Milz an d100 nach KMT	96
Abb. 4.43: Leukozytengehalt von Lamina propria und Epithel des Dünndarms nach haploidenter KMT und Treg-Therapie.....	97

Abb. 4.44: Analyse der Leukozytenpopulationen von Lamina propria und Epithel des Dünndarms nach haploidenter KMT und Treg-Therapie	98
Abb. 4.45: mRNA-Spiegel verschiedener Chemokine und Zytokine des Dünndarms an d40 und d100 nach haploidenter KMT	99
Abb. 4.46: Kinetik der Paneth-Zellen und Reg3 γ -Spiegel im Dünndarm nach haploidenter KMT und Treg-Therapie	100
Abb. 4.47: Leukozytengehalt von Lamina propria und Epithel des Colons nach haploidenter KMT und Treg-Therapie	102
Abb. 4.48: Analyse der Leukozytenpopulationen von Lamina propria und Epithel des Colons nach haploidenter KMT und Treg-Therapie	103
Abb. 4.49: Detaillierte durchflusszytometrische Analyse der Colon LPL an d40 nach KMT	104
Abb. 4.50: Detaillierte durchflusszytometrische Analyse der Colon IEL an d40 nach KMT	104
Abb. 4.51: Detaillierte durchflusszytometrische Analyse der Colon LPL an d100 nach KMT	105
Abb. 4.52: Detaillierte durchflusszytometrische Analyse der Colon IEL an d100 nach KMT	105
Abb. 4.53: mRNA-Spiegel verschiedener Chemokine und Zytokine des Colons an d40 nach haploidenter KMT	106
Abb. 4.54: mRNA-Spiegel verschiedener Chemokine und Zytokine des Colons an d100 nach haploidenter KMT	107
Abb. 4.55: Länge des Colons nach haploidenter KMT und Treg-Therapie	107
Abb. 4.56: Überleben, Gewicht und klinischer GVHD-Score nach 1-maliger versus 2-maliger Treg-Gabe	108
Abb. 4.57: Zellularität und Zusammensetzung des Knochenmarks nach 1-maliger bzw. 2-maliger Treg-Gabe	109
Abb. 4.58: B-Zell-Fraktionen im KM nach 1-maliger bzw. 2-maliger Treg-Gabe	110
Abb. 4.59: Zellularität und Zusammensetzung der Milz nach 1-maliger bzw. 2-maliger Treg-Gabe	110
Abb. 4.60: B-Zell-Fraktionen in der Milz nach 1-maliger bzw. 2-maliger Treg-Gabe	111
Abb. 4.61: Colonlänge und histologischer Score nach 1-maliger bzw. 2-maliger Treg-Gabe	111

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Chemikalien und Reagenzien	32
Tabelle 3.2: Medien und Lösungen	34
Tabelle 3.3: Antikörper für die Durchflusszytometrie	36
Tabelle 3.4: Kompensationsbeads	37
Tabelle 3.5: Primärantikörper für die Immunhistochemie	37

Tabelle 3.6: Sekundärantikörper für die Immunhistochemie	37
Tabelle 3.7: Magnetische Beads	37
Tabelle 3.8: Verbrauchsmaterialien	38
Tabelle 3.9: Geräte.....	39
Tabelle 3.10: Versuchstiere	39
Tabelle 3.11: Oligonukleotide	40
Tabelle 3.12: Antikörper für die Kompensation	44
Tabelle 3.13: Durchflusszytometrische Identifikation von Leukozytenpopulationen	47
Tabelle 3.14: GVHD-Bewertungsschema nach Cooke et al. (220).....	51
Tabelle 3.15: Entparaffinieren von in Paraffin eingebetteten Geweben.....	52
Tabelle 3.16: Hämatoxylin/Eosin-Färbung von in Paraffin eingebetteten Geweben	52
Tabelle 3.17: Histopathologisches Darm-GVHD-Bewertungsschema nach Kaplan et al. (221)	54
Tabelle 3.18: Histopathologisches Leber-GVHD-Bewertungsschema nach Kaplan et al. (221)	54
Tabelle 3.19: Histopathologisches Haut-GVHD-Bewertungsschema nach Grass et al. (222)	54
Tabelle 4.1: Stimulationsbedingungen in der Expansionskultur von Treg- und Tkonv-Zellen	60
Tabelle 4.2: Etablierung der Isolation von Lamina propria Leukozyten am Beispiel des Colons	68
Tabelle 4.3: Subpopulationen der CD11b ⁺ Zellen in der LP von Colon und Dünndarm unbehandelter Spender- und Empfängerermäuse	70

8 Literaturverzeichnis

1. Lai AY, Kondo M. T and B lymphocyte differentiation from hematopoietic stem cell. *Semin Immunol.* 2008;20(4):207-12.
2. Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(2):93-106.
3. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. 7. ed. Philadelphia, Pa.: Elsevier Saunders; 2012. 545 p.
4. Delves PJ, Roitt I. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med.* 2000;343(1):37-49.
5. Zinkernagel RM, Doherty PC. Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature.* 1974;248(5450):701-2.
6. Rammensee HG, Falk K, Rotzschke O. Peptides naturally presented by MHC class I molecules. *Annu Rev Immunol.* 1993;11:213-44.
7. Madden, Gorga JC, Strominger JL, Wiley DC. The structure of HLA-B27 reveals nonamer self-peptides bound in an extended conformation. *Nature.* 1991;353(6342):321-5.
8. Heath WR, Carbone FR. Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nat Rev Immunol.* 2001;1(2):126-34.
9. Klein J, Sato A. The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med.* 2000;343(10):702-9.
10. Nikolich-Zugich J, Slifka MK, Messaoudi I. The many important facets of T-cell repertoire diversity. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(2):123-32.
11. Abbas AK, Janeway CA. Immunology: improving on nature in the twenty-first century. *Cell.* 2000;100(1):129-38.
12. Hirahara K, Nakayama T. CD4+ T-cell subsets in inflammatory diseases: Beyond the Th1/Th2 paradigm. *Int Immunol.* 2016;28(4):163-71.
13. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today.* 1996;17(3):138-46.
14. Janeway CA, Chervonsky AV, Sant'Angelo D. T-cell receptors: is the repertoire inherently MHC-specific? *Curr Biol.* 1997;7(5):R299-300.
15. Crome SQ, Wang AY, Levings MK. Translational Mini-Review Series on Th17 Cells: Function and regulation of human T helper 17 cells in health and disease. *Clin Exp Immunol.* 2010;159(2):109-19.
16. Kaplan MH, Hufford MM, Olson MR. The Development and in vivo function of TH9 cells. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(5):295-307.

17. Passos GA, Mendes-da-Cruz DA, Oliveira EH. The Thymic Orchestration Involving Aire, miRNAs, and Cell-Cell Interactions during the Induction of Central Tolerance. *Front Immunol.* 2015;6:352.
18. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell.* 2008;133(5):775-87.
19. Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, Yagi H, Hori S, Fehervari Z, et al. Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev.* 2006;212:8-27.
20. Pereira LMS, Gomes STM, Ishak R, Vallinoto ACR. Regulatory T Cell and Forkhead Box Protein 3 as Modulators of Immune Homeostasis. *Front Immunol.* 2017;8:605.
21. Cortesini R, LeMaout J, Ciubotariu R, Cortesini NS. CD8+CD28- T suppressor cells and the induction of antigen-specific, antigen-presenting cell-mediated suppression of Th reactivity. *Immunol Rev.* 2001;182:201-6.
22. Arrenberg P, Halder R, Kumar V. Cross-regulation between distinct natural killer T cell subsets influences immune response to self and foreign antigens. *J Cell Physiol.* 2009;218(2):246-50.
23. Zhang ZX, Yang L, Young KJ, DuTemple B, Zhang L. Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression. *Nat Med.* 2000;6(7):782-9.
24. Hayday A, Tigelaar R. Immunoregulation in the tissues by gammadelta T cells. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(3):233-42.
25. Sakaguchi S, Takahashi T, Nishizuka Y. Study on cellular events in post-thymectomy autoimmune oophoritis in mice. II. Requirement of Lyt-1 cells in normal female mice for the prevention of oophoritis. *J Exp Med.* 1982;156(6):1577-86.
26. Fowell D, Mason D. Evidence that the T cell repertoire of normal rats contains cells with the potential to cause diabetes. Characterization of the CD4+ T cell subset that inhibits this autoimmune potential. *J Exp Med.* 1993;177(3):627-36.
27. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 1995;155(3):1151-64.
28. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepers B, Clark LB, Yasayko SA, et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet.* 2001; 27(1):68-73.
29. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2003;4(4):330-6.
30. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet.* 2001;27(1):20-1.
31. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* 2003;299(5609):1057-61.

32. Wu Y, Borde M, Heissmeyer V, Feuerer M, Lapan AD, Stroud JC, et al. FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell*. 2006;126(2):375-87.
33. Bettelli E, Dastrange M, Oukka M. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(14):5138-43.
34. Ohkura N, Kitagawa Y, Sakaguchi S. Development and maintenance of regulatory T cells. *Immunity*. 2013;38(3):414-23.
35. Huehn J, Polansky JK, Hamann A. Epigenetic control of FOXP3 expression: the key to a stable regulatory T-cell lineage? *Nat Rev Immunol*. 2009;9(2):83-9.
36. Jordan MS, Boesteanu A, Reed AJ, Petrone AL, Hohenbeck AE, Lerman MA, et al. Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol*. 2001;2(4):301-6.
37. Kawahata K, Misaki Y, Yamauchi M, Tsunekawa S, Setoguchi K, Miyazaki J, et al. Generation of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells from autoreactive T cells simultaneously with their negative selection in the thymus and from nonautoreactive T cells by endogenous TCR expression. *J Immunol*. 2002;168(9):4399-405.
38. Ohkura N, Hamaguchi M, Morikawa H, Sugimura K, Tanaka A, Ito Y, et al. T cell receptor stimulation-induced epigenetic changes and Foxp3 expression are independent and complementary events required for Treg cell development. *Immunity*. 2012;37(5):785-99.
39. Stephens L, Mottet C, Mason D, Powrie F. Human CD4(+)CD25(+) thymocytes and peripheral T cells have immune suppressive activity in vitro. *Eur J Immunol*. 2001;31(4):1247-54.
40. Weiss JM, Bilate AM, Gobert M, Ding Y, Curotto de Lafaille MA, Parkhurst CN, et al. Neuropilin 1 is expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosa-generated induced Foxp3+ T reg cells. *J Exp Med*. 2012;209(10):1723-42, S1.
41. Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:531-62.
42. Piccirillo CA, Shevach EM. Naturally-occurring CD4+CD25+ immunoregulatory T cells: central players in the arena of peripheral tolerance. *Semin Immunol*. 2004;16(2):81-8.
43. Thornton A, Donovan EE, Piccirillo CA, Shevach EM. Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *J Immunol*. 2004;172(11):6519-23.
44. Fisson S, Darrasse-Jeze G, Litvinova E, Septier F, Klatzmann D, Liblau R, et al. Continuous activation of autoreactive CD4+ CD25+ regulatory T cells in the steady state. *J Exp Med*. 2003;198(5):737-46.
45. Setoguchi R, Hori S, Takahashi T, Sakaguchi S. Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J Exp Med*. 2005;201(5):723-35.
46. Klein L, Khazaie K, Boehmer Hv. In vivo dynamics of antigen-specific regulatory T cells not predicted from behavior in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(15):8886-91.

47. Fehervari Z, Sakaguchi S. Control of Foxp3+ CD25+CD4+ regulatory cell activation and function by dendritic cells. *Int Immunol*. 2004;16(12):1769-80.
48. Kretschmer K, Apostolou I, Hawiger D, Khazaie K, Nussenzweig MC, Boehmer Hv. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat Immunol*. 2005;6(12):1219-27.
49. Polansky JK, Kretschmer K, Freyer J, Floess S, Garbe A, Baron U, et al. DNA methylation controls Foxp3 gene expression. *Eur J Immunol*. 2008;38(6):1654-63.
50. Chen ZM, O'Shaughnessy MJ, Gramaglia I, Panoskaltsis-Mortari A, Murphy WJ, Narula S, et al. IL-10 and TGF-beta induce alloreactive CD4+CD25- T cells to acquire regulatory cell function. *Blood*. 2003;101(12):5076-83.
51. Apostolou I, Boehmer Hv. In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *J Exp Med*. 2004;199(10):1401-8.
52. Floess S, Freyer J, Siewert C, Baron U, Olek S, Polansky J, et al. Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. *PLoS Biol*. 2007;5(2):e38.
53. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, et al. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med*. 2003;198(12):1875-86.
54. Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, Vries JEd, et al. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*. 1997;389(6652):737-42.
55. Cottrez F, Groux H. Specialization in tolerance: innate CD(4+)CD(25+) versus acquired TR1 and TH3 regulatory T cells. *Transplantation*. 2004;77(1 Suppl):S12-5.
56. Weiner HL. Induction and mechanism of action of transforming growth factor- β -secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev*. 2001;182(1):207-14.
57. Benson MJ, Pino-Lagos K, Roseblatt M, Noelle RJ. All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation. *J Exp Med*. 2007;204(8):1765-74.
58. Mucida D, Park Y, Kim G, Turovskaya O, Scott I, Kronenberg M, et al. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science*. 2007;317(5835):256-60.
59. Coombes JL, Siddiqui KR, Arancibia-Carcamo CV, Hall J, Sun CM, Belkaid Y, et al. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med*. 2007;204(8):1757-64.
60. Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, Iwata M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol*. 1998;10(12):1969-80.
61. Miyara M, Sakaguchi S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol Med*. 2007;13(3):108-16.

62. Cederbom L, Hall H, Ivars F. CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur J Immunol.* 2000;30(6):1538-43.
63. Shevach EM, McHugh RS, Piccirillo CA, Thornton A. Control of T-cell activation by CD4+ CD25+ suppressor T cells. *Immunol Rev.* 2001;182:58-67.
64. Thornton A, Shevach EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med.* 1998;188(2):287-96.
65. Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, Berger T, Schuler G. Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med.* 2001;193(11):1303-10.
66. Tang Q, Bluestone JA. The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat Immunol.* 2008;9(3):239-44.
67. Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol.* 2007;8(12):1353-62.
68. D'Cruz LM, Klein L. Development and function of agonist-induced CD25+Foxp3+ regulatory T cells in the absence of interleukin 2 signaling. *Nat Immunol.* 2005;6(11):1152-9.
69. Tran DQ, Glass DD, Uzel G, Darnell DA, Spalding C, Holland SM, et al. Analysis of adhesion molecules, target cells, and role of IL-2 in human FOXP3+ regulatory T cell suppressor function. *J Immunol.* 2009;182(5):2929-38.
70. Boehmer Hv. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol.* 2005;6(4):338-44.
71. Rubtsov YP, Rasmussen JP, Chi EY, Fontenot J, Castelli L, Ye X, et al. Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity.* 2008;28(4):546-58.
72. Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature.* 2007;450(7169):566-9.
73. Sanjabi S, Mosaheb MM, Flavell RA. Opposing effects of TGF-beta and IL-15 cytokines control the number of short-lived effector CD8+ T cells. *Immunity.* 2009;31(1):131-44.
74. Li MO, Wan YY, Flavell RA. T cell-produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation. *Immunity.* 2007;26(5):579-91.
75. Aoki CA, Borchers AT, Li M, Flavell RA, Bowlus CL, Ansari AA, et al. Transforming growth factor beta (TGF-beta) and autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2005;4(7):450-9.
76. Bopp T, Becker C, Klein M, Klein-Hessling S, Palmetshofer A, Serfling E, et al. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med.* 2007;204(6):1303-10.

77. Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, Sternjak A, Diamantini A, Giometto R, et al. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3⁺ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood*. 2007;110(4):1225-32.
78. Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med*. 2007;204(6):1257-65.
79. Kobie JJ, Shah PR, Yang L, Rebhahn JA, Fowell DJ, Mosmann TR. T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine. *J Immunol*. 2006;177(10):6780-6.
80. Zarek PE, Huang CT, Lutz ER, Kowalski J, Horton, Linden J, et al. A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. *Blood*. 2008;111(1):251-9.
81. Gondek DC, Lu LF, Quezada SA, Sakaguchi S, Noelle RJ. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol*. 2005;174(4):1783-6.
82. Zhao DM, Thornton A, DiPaolo RJ, Shevach EM. Activated CD4⁺CD25⁺ T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood*. 2006;107(10):3925-32.
83. Garin MI, Chu CC, Golshayan D, Cernuda-Morollon E, Wait R, Lechler RI. Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4⁺CD25⁺ T cells. *Blood*. 2007;109(5):2058-65.
84. Scalapino KJ, Tang Q, Bluestone JA, Bonyhadi ML, Daikh DI. Suppression of disease in New Zealand Black/New Zealand White lupus-prone mice by adoptive transfer of ex vivo expanded regulatory T cells. *J Immunol*. 2006;177(3):1451-9.
85. Tang Q, Krummel MF. Imaging the function of regulatory T cells in vivo. *Curr Opin Immunol*. 2006;18(4):496-502.
86. Bachmann MF, Kohler G, Ecabert B, Mak TW, Kopf M. Cutting edge: lymphoproliferative disease in the absence of CTLA-4 is not T cell autonomous. *J Immunol*. 1999;163(3):1128-31.
87. Read S, Malmstrom V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25⁺CD4⁺ regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med*. 2000;192(2):295-302.
88. Read S, Greenwald R, Izcue A, Robinson N, Mandelbrot D, Francisco L, et al. Blockade of CTLA-4 on CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells abrogates their function in vivo. *J Immunol*. 2006;177(7):4376-83.
89. Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med*. 2000;192(2):303-10.
90. Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW, Orabona C, Vacca C, Bianchi R, et al. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003;4(12):1206-12.

91. Fallarino F, Grohmann U, You S, McGrath BC, Cavener, Vacca C, et al. The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *J Immunol.* 2006;176(11):6752-61.
92. Paust S, Lu L, McCarty N, Cantor H. Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(28):10398-403.
93. Lee GK, Park HJ, Macleod M, Chandler P, Munn DH, Mellor AL. Tryptophan deprivation sensitizes activated T cells to apoptosis prior to cell division. *Immunology.* 2002;107(4):452-60.
94. Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, et al. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science.* 2008;322(5899):271-5.
95. Misra N, Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Kazatchkine MD, Kaveri SV. Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *J Immunol.* 2004;172(8):4676-80.
96. Bodor J, Fehervari Z, Diamond B, Sakaguchi S. ICER/CREM-mediated transcriptional attenuation of IL-2 and its role in suppression by regulatory T cells. *Eur J Immunol.* 2007;37(4):884-95.
97. Bodor J, Fehervari Z, Diamond B, Sakaguchi S. Regulatory T cell-mediated suppression: potential role of ICER. *J Leukoc Biol.* 2007;81(1):161-7.
98. Kingsley CI, Karim M, Bushell AR, Wood KJ. CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. *J Immunol.* 2002;168(3):1080-6.
99. Huang CT, Workman CJ, Flies D, Pan X, Marson AL, Zhou G, et al. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity.* 2004;21(4):503-13.
100. Liang B, Workman C, Lee J, Chew C, Dale BM, Colonna L, et al. Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *J Immunol.* 2008;180(9):5916-26.
101. Workman CJ, Vignali DA. Negative regulation of T cell homeostasis by lymphocyte activation gene-3 (CD223). *J Immunol.* 2005;174(2):688-95.
102. Yu X, Harden K, Gonzalez LC, Francesco M, Chiang E, Irving B, et al. The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. *Nat Immunol.* 2009;10(1):48-57.
103. Tadokoro CE, Shakhar G, Shen S, Ding Y, Lino AC, Maraver A, et al. Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4+ T cells and dendritic cells in vivo. *J Exp Med.* 2006;203(3):505-11.
104. Sarris M, Andersen KG, Randow F, Mayr L, Betz AG. Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition. *Immunity.* 2008;28(3):402-13.

105. Solomon BD, Mueller C, Chae W-J, Alabanza LM, Bynoe MS. Neuropilin-1 attenuates autoreactivity in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(5):2040-5.
106. Travis MA, Reizis B, Melton AC, Masteller E, Tang Q, Proctor JM, et al. Loss of integrin $\alpha(v)\beta 8$ on dendritic cells causes autoimmunity and colitis in mice. *Nature*. 2007;449(7160):361-5.
107. McCoy CE, Sheedy FJ, Qualls JE, Doyle SL, Quinn SR, Murray PJ, et al. IL-10 inhibits miR-155 induction by toll-like receptors. *J Biol Chem*. 2010;285(27):20492-8.
108. Couban S, Barnett M. The source of cells for allografting. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2003;9(11):669-73.
109. Kurtzberg J, Laughlin M, Graham ML, Smith C, Olson JF, Halperin EC, et al. Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients. *N Engl J Med*. 1996;335(3):157-66.
110. Rubinstein P, Stevens CE. Placental blood for bone marrow replacement: the New York Blood Center's program and clinical results. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol*. 2000;13(4):565-84.
111. Kahan BD. Cyclosporine. *N Engl J Med*. 1989;321(25):1725-38.
112. Jolivet J, Cowan KH, Curt GA, Clendeninn NJ, Chabner BA. The pharmacology and clinical use of methotrexate. *N Engl J Med*. 1983;309(18):1094-104.
113. Hill GR, Crawford JM, Cooke KR, Brinson YS, Pan L, Ferrara JL. Total body irradiation and acute graft-versus-host disease: the role of gastrointestinal damage and inflammatory cytokines. *Blood*. 1997;90(8):3204-13.
114. Hill GR, Teshima T, Gerbitz A, Pan L, Cooke KR, Brinson YS, et al. Differential roles of IL-1 and TNF- α on graft-versus-host disease and graft versus leukemia. *J Clin Invest*. 1999;104(4):459-67.
115. Baron F, Baker JE, Storb R, Gooley TA, Sandmaier BM, Maris MB, et al. Kinetics of engraftment in patients with hematologic malignancies given allogeneic hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative conditioning. *Blood*. 2004;104(8):2254-62.
116. Gratwohl A, Brand R, Apperley J, Biezen AA, Bandini G, Devergie A, et al. Graft-versus-host disease and outcome in HLA-identical sibling transplantations for chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2002;100(12):3877-86.
117. Hertenstein B, Hampl W, Bunjes D, Wiesneth M, Duncker C, Koszinowski U, et al. In vivo/ex vivo T cell depletion for GVHD prophylaxis influences onset and course of active cytomegalovirus infection and disease after BMT. *Bone Marrow Transplant*. 1995;15(3):387-93.
118. Martino R, Subira M, Rovira M, Solano C, Vazquez L, Sanz GF, et al. Invasive fungal infections after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: incidence and risk factors in 395 patients. *Br J Haematol*. 2002;116(2):475-82.
119. Ferrara JLM, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet*. 2009;373(9674):1550-61.

120. Dzierzak-Mietla M, Markiewicz M, Siekiera U, Mizia S, Koclega A, Zielinska P, et al. Occurrence and Impact of Minor Histocompatibility Antigens' Disparities on Outcomes of Hematopoietic Stem Cell Transplantation from HLA-Matched Sibling Donors. *Bone Marrow Res.* 2012;2012.
121. Hambach L, Spierings E, Goulmy E. Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: minor histocompatibility antigens. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2007;20(2):171-87.
122. Devine SM, Carter S, Soiffer RJ, Pasquini MC, Hari PN, Stein A, et al. Low risk of chronic graft-versus-host disease and relapse associated with T cell-depleted peripheral blood stem cell transplantation for acute myelogenous leukemia in first remission: results of the blood and marrow transplant clinical trials network protocol 0303. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2011;17(9):1343-51.
123. Bertaina A, Merli P, Rutella S, Pagliara D, Bernardo ME, Masetti R, et al. HLA-haploidentical stem cell transplantation after removal of alphabeta+ T and B cells in children with nonmalignant disorders. *Blood.* 2014;124(5):822-6.
124. Bethge WA, Faul C, Bornhauser M, Stuhler G, Beelen DW, Lang P, et al. Haploidentical allogeneic hematopoietic cell transplantation in adults using CD3/CD19 depletion and reduced intensity conditioning: an update. *Blood Cells Mol Dis.* 2008;40(1):13-9.
125. Small TN, Avigan D, Dupont B, Smith K, Black P, Heller G, et al. Immune reconstitution following T-cell depleted bone marrow transplantation: effect of age and posttransplant graft rejection prophylaxis. *Biol Blood Marrow Transplant.* 1997;3(2):65-75.
126. Marmont AM, Horowitz MM, Gale RP, Sobocinski K, Ash RC, van Bekkum DW, et al. T-cell depletion of HLA-identical transplants in leukemia. *Blood.* 1991;78(8):2120-30.
127. Keever CA, Small TN, Flomenberg N, Heller G, Pekle K, Black P, et al. Immune reconstitution following bone marrow transplantation: comparison of recipients of T-cell depleted marrow with recipients of conventional marrow grafts. *Blood.* 1989;73(5):1340-50.
128. Ferrara JL, Reddy P. Pathophysiology of graft-versus-host disease. *Semin Hematol.* 2006;43(1):3-10.
129. Sullivan KM, Mori M, Sanders J, Siadak M, Witherspoon RP, Anasetti C, et al. Late complications of allogeneic and autologous marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1992;10 Suppl 1:127-34.
130. Jagasia MH, Greinix HT, Arora M, Williams KM, Wolff D, Cowen EW, et al. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. The 2014 Diagnosis and Staging Working Group report. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015;21(3):389-401.e1.
131. Reddy P. Pathophysiology of acute graft-versus-host disease. *Hematol Oncol.* 2003;21(4):149-61.
132. Sale GE. Does graft-versus-host disease attack epithelial stem cells? *Mol Med Today.* 1996;2(3):114-9.

133. Glucksberg H, Storb R, Fefer A, Buckner CD, Neiman PE, Clift RA, et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation*. 1974;18(4):295-304.
134. Rowlings PA, Przepiorka D, Klein JP, Gale RP, Passweg JR, Henslee-Downey PJ, et al. IBMTR Severity Index for grading acute graft-versus-host disease: Retrospective comparison with Glucksberg grade. *Br J Haematol*. 1997;97(4):855-64.
135. MacMillan ML, Robin M, Harris AC, DeFor TE, Martin PJ, Alousi A, et al. A refined risk score for acute GVHD that predicts response to initial therapy, survival and transplant-related mortality. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;21(4):761-7.
136. Hill GR, Ferrara JL. The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*. 2000;95(9):2754-9.
137. Chang RJ, Lee SH. Effects of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha on the expression of an Ia antigen on a murine macrophage cell line. *J Immunol*. 1986;137(9):2853-6.
138. Pober JS, Orosz CG, Rose ML, Savage CO. Can graft endothelial cells initiate a host anti-graft immune response? *Transplantation*. 1996;61(3):343-9.
139. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science*. 2002;296(5566):301-5.
140. Teshima T, Ferrara JL. Understanding the alloresponse: new approaches to graft-versus-host disease prevention. *Semin Hematol*. 2002;39(1):15-22.
141. Beilhack A, Schulz S, Baker J, Beilhack GF, Wieland CB, Herman EI, et al. In vivo analyses of early events in acute graft-versus-host disease reveal sequential infiltration of T-cell subsets. *Blood*. 2005;106(3):1113-22.
142. Shlomchik WD, Couzens MS, Tang CB, McNiff J, Robert ME, Liu J, et al. Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science*. 1999;285(5426):412-5.
143. Liu K, Anthony BA, Yearsly MM, Hamadani M, Gaughan A, Wang J-J, et al. CD103 deficiency prevents graft-versus-host disease but spares graft-versus-tumor effects mediated by alloreactive CD8 T cells. *PLoS One*. 2011;6(7):e21968.
144. Hornick P, Lechler R. Direct and indirect pathways of alloantigen recognition: relevance to acute and chronic allograft rejection. *Nephrol Dial Transplant*. 1997;12(9):1806-10.
145. Ho IC, Glimcher LH. Transcription: tantalizing times for T cells. *Cell*. 2002;109 Suppl:S109-20.
146. Tseng SY, Dustin ML. T-cell activation: a multidimensional signaling network. *Curr Opin Cell Biol*. 2002;14(5):575-80.
147. Antin JH, Ferrara JL. Cytokine dysregulation and acute graft-versus-host disease. *Blood*. 1992;80(12):2964-8.
148. Moser B, Loetscher P. Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat Immunol*. 2001;2(2):123-8.

149. Coghill JM, Sarantopoulos S, Moran TP, Murphy WJ, Blazar BR, Serody JS. Effector CD4+ T cells, the cytokines they generate, and GVHD: something old and something new. *Blood*. 2011;117(12):3268-76.
150. Kagi D, Vignaux F, Ledermann B, Burki K, Depraetere V, Nagata S, et al. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science*. 1994;265(5171):528-30.
151. Russell JH, Ley TJ. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:323-70.
152. Bollrath J, Powrie FM. Controlling the frontier: regulatory T-cells and intestinal homeostasis. *Semin Immunol*. 2013;25(5):352-7.
153. Okumura R, Takeda K. Roles of intestinal epithelial cells in the maintenance of gut homeostasis. *Exp Mol Med*. 2017;49(5):e338.
154. Ayabe T, Satchell DP, Wilson CL, Parks WC, Selsted ME, Ouellette AJ. Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nat Immunol*. 2000;1(2):113-8.
155. Abt MC, Osborne LC, Monticelli L, Doering TA, Alenghat T, Sonnenberg GF, et al. Commensal bacteria calibrate the activation threshold of innate antiviral immunity. *Immunity*. 2012;37(1):158-70.
156. Sun M, He C, Cong Y, Liu Z. Regulatory immune cells in regulation of intestinal inflammatory response to microbiota. *Mucosal Immunol*. 2015;8(5):969-78.
157. Cheroutre H, Lambolez F, Mucida D. The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(7):445-56.
158. Cheroutre H, Lambolez F. Doubting the TCR coreceptor function of CD8alphaalpha. *Immunity*. 2008;28(2):149-59.
159. Simpson SJ, Hollander GA, Mizoguchi E, Allen D, Bhan AK, Wang B, et al. Expression of pro-inflammatory cytokines by TCR alpha beta+ and TCR gamma delta+ T cells in an experimental model of colitis. *Eur J Immunol*. 1997;27(1):17-25.
160. Inagaki-Ohara K, Chinen T, Matsuzaki G, Sasaki A, Sakamoto Y, Hiromatsu K, et al. Mucosal T cells bearing TCRgammadelta play a protective role in intestinal inflammation. *J Immunol*. 2004;173(2):1390-8.
161. Fay NS, Larson EC, Jameson JM. Chronic Inflammation and $\gamma \delta$ T Cells. *Front Immunol*. 2016;7:210.
162. van Wijk F, Cheroutre H. Intestinal T cells: facing the mucosal immune dilemma with synergy and diversity. *Semin Immunol*. 2009;21(3):130-8.
163. Denning TL, Granger SW, Mucida D, Graddy R, Leclercq G, Zhang W, et al. Mouse TCRalpha beta+CD8alphaalpha intraepithelial lymphocytes express genes that down-regulate their antigen reactivity and suppress immune responses. *J Immunol*. 2007;178(7):4230-9.
164. Zook EC, Kee BL. Development of innate lymphoid cells. *Nat Immunol*. 2016;17(7):775-82.

165. Martin NT, Martin MU. Interleukin 33 is a guardian of barriers and a local alarmin. *Nat Immunol.* 2016;17(2):122-31.
166. Spits H, Di Santo JP. The expanding family of innate lymphoid cells: regulators and effectors of immunity and tissue remodeling. *Nat Immunol.* 2011;12(1):21-7.
167. Song C, Lee JS, Gilfillan S, Robinette ML, Newberry RD, Stappenbeck TS, et al. Unique and redundant functions of NKp46+ ILC3s in models of intestinal inflammation. *J Exp Med.* 2015;212(11):1869-82.
168. Johansson JE, Brune M, Ekman T. The gut mucosa barrier is preserved during allogeneic, haemopoietic stem cell transplantation with reduced intensity conditioning. *Bone Marrow Transplant.* 2001;28(8):737-42.
169. Hanash A, Dudakov JA, Hua G, O'Connor MH, Young LF, Singer NV, et al. Interleukin-22 protects intestinal stem cells from immune-mediated tissue damage and regulates sensitivity to graft versus host disease. *Immunity.* 2012;37(2):339-50.
170. Jenq RR, Ubeda C, Taur Y, Menezes CC, Khanin R, Dudakov JA, et al. Regulation of intestinal inflammation by microbiota following allogeneic bone marrow transplantation. *J Exp Med.* 2012;209(5):903-11.
171. Eriguchi Y, Takashima S, Oka H, Shimoji S, Nakamura K, Uryu H, et al. Graft-versus-host disease disrupts intestinal microbial ecology by inhibiting Paneth cell production of alpha-defensins. *Blood.* 2012;120(1):223-31.
172. Eriguchi Y, Nakamura K, Hashimoto D, Shimoda S, Shimono N, Akashi K, et al. Decreased secretion of Paneth cell alpha-defensins in graft-versus-host disease. *Transpl Infect Dis.* 2015;17(5):702-6.
173. Levine JE, Huber E, Hammer ST, Harris AC, Greenson JK, Braun TM, et al. Low Paneth cell numbers at onset of gastrointestinal graft-versus-host disease identify patients at high risk for nonrelapse mortality. *Blood.* 2013;122(8):1505-9.
174. Ferrara JL, Harris AC, Greenson JK, Braun TM, Holler E, Teshima T, et al. Regenerating islet-derived 3-alpha is a biomarker of gastrointestinal graft-versus-host disease. *Blood.* 2011;118(25):6702-8.
175. Shono Y, Docampo MD, Peled JU, Perobelli SM, Jenq RR. Intestinal microbiota-related effects on graft-versus-host disease. *Int J Hematol.* 2015;101(5):428-37.
176. Suenaga F, Ueha S, Abe J, Kosugi-Kanaya M, Wang Y, Yokoyama A, et al. Loss of lymph node fibroblastic reticular cells and high endothelial cells is associated with humoral immunodeficiency in mouse graft-versus-host disease. *J Immunol.* 2015;194(1):398-406.
177. Abedi, Hammarstrom L, Ringden O, Smith CI. Development of IgA deficiency after bone marrow transplantation. The influence of acute and chronic graft-versus-host disease. *Transplantation.* 1990;50(3):415-21.
178. Heimesaat MM, Nogai A, Bereswill S, Plickert R, Fischer A, Loddenkemper C, et al. MyD88/TLR9 mediated immunopathology and gut microbiota dynamics in a novel murine model of intestinal graft-versus-host disease. *Gut.* 2010;59(8):1079-87.

179. Atarashi K, Tanoue T, Oshima K, Suda W, Nagano Y, Nishikawa H, et al. Treg induction by a rationally selected mixture of *Clostridia* strains from the human microbiota. *Nature*. 2013;500(7461):232-6.
180. Jenq RR, Taur Y, Devlin SM, Ponce DM, Goldberg JD, Ahr KF, et al. Intestinal *Blautia* Is Associated with Reduced Death from Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;21(8):1373-83.
181. Taur Y, Xavier JB, Lipuma L, Ubeda C, Goldberg J, Gobourne A, et al. Intestinal domination and the risk of bacteremia in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis*. 2012;55(7):905-14.
182. Shono Y, Docampo MD, Peled JU, Perobelli SM, Velardi E, Tsai JJ, et al. Increased GVHD-related mortality with broad-spectrum antibiotic use after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in human patients and mice. *Sci Transl Med*. 2016;8(339):339ra71.
183. Holler E, Butzhammer P, Schmid K, Hundsrucker C, Koestler J, Peter K, et al. Metagenomic analysis of the stool microbiome in patients receiving allogeneic stem cell transplantation: loss of diversity is associated with use of systemic antibiotics and more pronounced in gastrointestinal graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014;20(5):640-5.
184. Saliba R, Couriel D, Giralt S, Rondon G, Okoroji GJ, Rashid A, et al. Prognostic value of response after upfront therapy for acute GVHD. *Bone Marrow Transplant*. 2012;47(1):125-31.
185. Martin PJ, Rizzo JD, Wingard, Ballen K, Curtin PT, Cutler C, et al. First- and second-line systemic treatment of acute graft-versus-host disease: recommendations of the American Society of Blood and Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012;18(8):1150-63.
186. Koreth J, Antin JH. Current and future approaches for control of graft-versus-host disease. *Expert Rev Hematol*. 2008;1(1):111.
187. Baron F, Humblet-Baron S, Ehx G, Servais S, Hannon M, Belle L, et al. Thinking out of the box--new approaches to controlling GVHD. *Curr Hematol Malig Rep*. 2014;9(1):73-84.
188. Rubegni P, Feci L, Poggiali S, Marotta G, D'Ascenzo G, Murdaca F, et al. Extracorporeal photopheresis: a useful therapy for patients with steroid-refractory acute graft-versus-host disease but not for the prevention of the chronic form. *Br J Dermatol*. 2013;169(2):450-7.
189. Gasparro FP, Chan G, Edelson RL. Phototherapy and photopharmacology. *Yale J Biol Med*. 1985;58(6):519-34.
190. Gatza E, Rogers CE, Clouthier SG, Lowler KP, Tawara I, Liu C, et al. Extracorporeal photopheresis reverses experimental graft-versus-host disease through regulatory T cells. *Blood*. 2008;112(4):1515-21.
191. Sakaguchi S, Fukuma K, Kuribayashi K, Masuda T. Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active

- participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. *J Exp Med*. 1985;161(1):72-87.
192. Powrie F, Mason D. OX-22high CD4+ T cells induce wasting disease with multiple organ pathology: Prevention by the OX-22low subset. *J Exp Med*. 1990;172(6):1701-8.
 193. Cohen JL, Trenado A, Vasey D, Klatzmann D, Salomon BL. CD4+CD25+ Immunoregulatory T Cells New Therapeutics for Graft-Versus-Host Disease. *J Exp Med*. 2002;196(3):401-6.
 194. Joffre O, Gorsse N, Romagnoli P, Hudrisier D, Meerwijk JPMv. Induction of antigen-specific tolerance to bone marrow allografts with CD4+CD25+ T lymphocytes. *Blood*. 2004;103(11):4216-21.
 195. Taylor PA. The infusion of ex vivo activated and expanded CD4+CD25+ immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood*. 2002;99(10):3493-9.
 196. Trenado A, Charlotte F, Fisson S, Yagello M, Klatzmann D, Salomon BL, et al. Recipient-type specific CD4+CD25+ regulatory T cells favor immune reconstitution and control graft-versus-host disease while maintaining graft-versus-leukemia. *J Clin Invest*. 2003;112(11):1688-96.
 197. Hoffmann P, Ermann J, Edinger M, Fathman CG, Strober S. Donor-type CD4 + CD25 + Regulatory T Cells Suppress Lethal Acute Graft-Versus-Host Disease after Allogeneic Bone Marrow Transplantation. *J Exp Med*. 2002;196(3):389-99.
 198. Edinger M, Hoffmann P, Ermann J, Drago K, Fathman CG, Strober S, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat Med*. 2003;9(9):1144-50.
 199. Yang J, Fan H, Hao J, Ren Y, Chen L, Li G, et al. Amelioration of acute graft-versus-host disease by adoptive transfer of ex vivo expanded human cord blood CD4+CD25+ forkhead box protein 3+ regulatory T cells is associated with the polarization of Treg/Th17 balance in a mouse model. *Transfusion*. 2012;52(6):1333-47.
 200. Ermann J, Hoffmann P, Edinger M, Dutt S, Blankenberg FG, Higgins JP, et al. Only the CD62L+ subpopulation of CD4+CD25+ regulatory T cells protects from lethal acute GVHD. *Blood*. 2005;105(5):2220-6.
 201. Hanash A, Levy RB. Donor CD4+CD25+ T cells promote engraftment and tolerance following MHC-mismatched hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2005;105(4):1828-36.
 202. Nguyen VH, Zeiser R, Dasilva DL, Chang DS, Beilhack A, Contag CH, et al. In vivo dynamics of regulatory T-cell trafficking and survival predict effective strategies to control graft-versus-host disease following allogeneic transplantation. *Blood*. 2007;109(6):2649-56.
 203. Taylor PA, Panoskaltsis-Mortari A, Swedin JM, Lucas PJ, Gress RE, Levine BL, et al. L-Selectin(hi) but not the L-selectin(lo) CD4+25+ T-regulatory cells are potent inhibitors of GVHD and BM graft rejection. *Blood*. 2004;104(12):3804-12.

204. Butcher EC, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science*. 1996;272(5258):60-6.
205. Xu L, Kitani A, Fuss I, Strober W. Cutting edge: regulatory T cells induce CD4+CD25-Foxp3- T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-beta. *J Immunol*. 2007;178(11):6725-9.
206. Koenen HJ, Smeets RL, Vink PM, van Rijssen E, Boots A, Joosten I. Human CD25highFoxp3pos regulatory T cells differentiate into IL-17-producing cells. *Blood*. 2008;112(6):2340-52.
207. Koenecke C, Czeloth N, Bubke A, Schmitz S, Kissenpfennig A, Malissen B, et al. Alloantigen-specific de novo-induced Foxp3+ Treg revert in vivo and do not protect from experimental GVHD. *Eur J Immunol*. 2009;39(11):3091-6.
208. Beres A, Komorowski R, Mihara M, Drobyski WR. Instability of Foxp3 expression limits the ability of induced regulatory T cells to mitigate graft versus host disease. *Clin Cancer Res*. 2011;17(12):3969-83.
209. Hoffmann P, Eder R, Edinger M. Polyclonal expansion of human CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Methods Mol Biol*. 2011;677:15-30.
210. Brunstein CG, Miller JS, Cao Q, McKenna DH, Hippen KL, Curtsinger J, et al. Infusion of ex vivo expanded T regulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood: safety profile and detection kinetics. *Blood*. 2011;117(3):1061-70.
211. Di Ianni M, Falzetti F, Carotti A, Terenzi A, Castellino F, Bonifacio E, et al. Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. *Blood*. 2011;117(14):3921-8.
212. Hippen KL, Merkel SC, Schirm DK, Nelson C, Tennis NC, Riley JL, et al. Generation and Large-Scale Expansion of Human Inducible Regulatory T Cells That Suppress Graft-Versus-Host Disease. *Am J Transplant*. 2011;11(6):1148-57.
213. Chakraborty R, Mahendravada A, Perna SK, Rooney CM, Heslop HE, Vera JF, et al. Robust and cost effective expansion of human regulatory T cells highly functional in a xenograft model of graft-versus-host disease. *Haematologica*. 2013;98(4):533-7.
214. Hoffmann P, Eder R, Boeld TJ, Doser K, Piseshka B, Andreesen R, et al. Only the CD45RA+ subpopulation of CD4+CD25high T cells gives rise to homogeneous regulatory T-cell lines upon in vitro expansion. *Blood*. 2006;108(13):4260-7.
215. Hoffmann P, Eder R, Kunz-Schughart LA, Andreesen R, Edinger M. Large-scale in vitro expansion of polyclonal human CD4(+)CD25high regulatory T cells. *Blood*. 2004;104(3):895-903.
216. Power UF, Huss T, Michaud V, Plotnicky-Gilquin H, Bonnefoy J-Y, Nguyen TN. Differential Histopathology and Chemokine Gene Expression in Lung Tissues following Respiratory Syncytial Virus (RSV) Challenge of Formalin-Inactivated RSV- or BBG2Na-Immunized Mice. *J Virol*. 2001;75(24):12421-30.
217. Matsushita T, Yanaba K, Bouaziz J-D, Fujimoto M, Tedder TF. Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. *J Clin Invest*. 2008;118(10):3420-30.

218. Jupelli M, Guentzel MN, Meier PA, Zhong G, Murthy AK, Arulanandam BP. Endogenous IFN-gamma production is induced and required for protective immunity against pulmonary chlamydial infection in neonatal mice. *J Immunol.* 2008;180(6):4148-55.
219. Huppert J, Closhen D, Croxford A, White R, Kulig P, Pietrowski E, et al. Cellular mechanisms of IL-17-induced blood-brain barrier disruption. *FASEB J.* 2010;24(4):1023-34.
220. Cooke KR, Kobzik L, Martin TR, Brewer J, Delmonte J, Crawford JM, et al. An experimental model of idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation: I. The roles of minor H antigens and endotoxin. *Blood.* 1996;88(8):3230-9.
221. Kaplan DH, Anderson BE, McNiff JM, Jain D, Shlomchik MJ, Shlomchik WD. Target antigens determine graft-versus-host disease phenotype. *J Immunol.* 2004;173(9):5467-75.
222. Grass JA, Wafa T, Reames A, Wages D, Corash L, Ferrara JL, et al. Prevention of transfusion-associated graft-versus-host disease by photochemical treatment. *Blood.* 1999;93(9):3140-7.
223. Tang Q, Henriksen KJ, Bi M, Finger EB, Szot G, Ye J, et al. In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. *J Exp Med.* 2004;199(11):1455-65.
224. Baker MB, Riley RL, Podack ER, Levy RB. Graft-versus-host-disease-associated lymphoid hypoplasia and B cell dysfunction is dependent upon donor T cell-mediated Fas-ligand function, but not perforin function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(4):1366-71.
225. Wall DA, Hamberg SD, Reynolds DS, Burakoff SJ, Abbas AK, Ferrara JL. Immunodeficiency in graft-versus-host disease. I. Mechanism of immune suppression. *J Immunol.* 1988;140(9):2970-6.
226. Storek J, Joseph A, Dawson MA, Douek DC, Storer B, Maloney DG. Factors influencing T-lymphopoiesis after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Transplantation.* 2002;73(7):1154-8.
227. Hardy RR, Carmack CE, Shinton SA, Kemp JD, Hayakawa K. Pillars Article: Resolution and Characterization of Pro-B and Pre-Pro-B Cell Stages in Normal Mouse Bone Marrow. *J Exp Med.* 1991. 173:1213-1225. *J Immunol.* 2012;189(7):3271-83.
228. Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood.* 1990;75(3):555-62.
229. Seggewiss R, Einsele H. Immune reconstitution after allogeneic transplantation and expanding options for immunomodulation: an update. *Blood.* 2010;115(19):3861-8.
230. Swain SL, McKinsty KK, Strutt TM. Expanding roles for CD4(+) T cells in immunity to viruses. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(2):136-48.
231. Peggs KS. Immune reconstitution following stem cell transplantation. *Leuk Lymphoma.* 2004;45(6):1093-101.

232. Abrahamsen IW, Somme S, Heldal D, Egeland T, Kvale D, Tjonnfjord GE. Immune reconstitution after allogeneic stem cell transplantation: the impact of stem cell source and graft-versus-host disease. *Haematologica*. 2005;90(1):86-93.
233. Imamura M. Immunological reconstitution and immunoregulatory cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Hematol*. 2002;76 Suppl 1:191-4.
234. Rottman M, Soudais C, Vogt G, Renia L, Emile J-F, Decaluwe H, et al. IFN-gamma mediates the rejection of haematopoietic stem cells in IFN-gammaR1-deficient hosts. *PLoS Med*. 2008;5(1):e26.
235. Capitini CM, Herby S, Milliron M, Anver MR, Mackall CL, Fry TJ. Bone marrow deficient in IFN- γ signaling selectively reverses GVHD-associated immunosuppression and enhances a tumor-specific GVT effect. *Blood*. 2009;113(20):5002-9.
236. Shono Y, Ueha S, Wang Y, Abe J, Kurachi M, Matsuno Y, et al. Bone marrow graft-versus-host disease: early destruction of hematopoietic niche after MHC-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2010;115(26):5401-11.
237. Shono Y, Shiratori S, Kosugi-Kanaya M, Ueha S, Sugita J, Shigematsu A, et al. Bone marrow graft-versus-host disease: evaluation of its clinical impact on disrupted hematopoiesis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014;20(4):495-500.
238. Nguyen VH, Shashidhar S, Chang DS, Ho L, Kambham N, Bachmann M, et al. The impact of regulatory T cells on T-cell immunity following hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2008;111(2):945-53.
239. Takashima S, Kadowaki M, Aoyama K, Koyama M, Oshima T, Tomizuka K, et al. The Wnt agonist R-spondin1 regulates systemic graft-versus-host disease by protecting intestinal stem cells. *J Exp Med*. 2011;208(2):285-94.
240. Teshima T, Ordemann R, Reddy P, Gagin S, Liu C, Cooke KR, et al. Acute graft-versus-host disease does not require alloantigen expression on host epithelium. *Nat Med*. 2002;8(6):575-81.
241. Wolff D, Ayuk F, Elmaagacli A, Bertz H, Lawitschka A, Schleuning M, et al. Current practice in diagnosis and treatment of acute graft-versus-host disease: results from a survey among German-Austrian-Swiss hematopoietic stem cell transplant centers. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013;19(5):767-76. Epub 2013/02/05.
242. Gaidot A, Landau DA, Martin GH, Bonduelle O, Grinberg-Bleyer Y, Matheoud D, et al. Immune reconstitution is preserved in hematopoietic stem cell transplantation coadministered with regulatory T cells for GVHD prevention. *Blood*. 2011;117(10):2975-83.
243. Martelli MF, Di Ianni M, Ruggeri L, Falzetti F, Carotti A, Terenzi A, et al. HLA-haploidentical transplantation with regulatory and conventional T-cell adoptive immunotherapy prevents acute leukemia relapse. *Blood*. 2014;124(4):638-44. Epub 2014/06/14.
244. Pierini A, Strober W, Moffett C, Baker J, Nishikii H, Alvarez M, et al. TNF-alpha priming enhances CD4⁺FoxP3⁺ regulatory T-cell suppressive function in murine GVHD prevention and treatment. *Blood*. 2016;128(6):866-71.

245. Sebastian M, Lopez-Ocasio M, Metidji A, Rieder SA, Shevach EM, Thornton AM. Helios Controls a Limited Subset of Regulatory T Cell Functions. *J Immunol.* 2016;196(1):144-55.
246. Thornton AM, Korty PE, Tran DQ, Wohlfert EA, Murray PE, Belkaid Y, et al. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3⁺ T regulatory cells. *J Immunol.* 2010;184(7):3433-41.
247. Sugimoto N, Oida T, Hirota K, Nakamura K, Nomura T, Uchiyama T, et al. Foxp3-dependent and -independent molecules specific for CD25⁺CD4⁺ natural regulatory T cells revealed by DNA microarray analysis. *Int Immunol.* 2006;18(8):1197-209.
248. Gottschalk RA, Corse E, Allison JP. Expression of Helios in peripherally induced Foxp3⁺ regulatory T cells. *J Immunol.* 2012;188(3):976-80.
249. Verhagen J, Wraith DC. Comment on "Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3⁺ T regulatory cells". *J Immunol.* 2010;185(12):7129; author reply 30.
250. Petzold C, Steinbronn N, Gereke M, Strasser RH, Sparwasser T, Bruder D, et al. Fluorochrome-based definition of naturally occurring Foxp3(+) regulatory T cells of intra- and extrathymic origin. *Eur J Immunol.* 2014;44(12):3632-45.
251. Yadav M, Louvet C, Davini D, Gardner JM, Martinez-Llordella M, Bailey-Bucktrout S, et al. Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets in vivo. *J Exp Med.* 2012;209(10):1713-22, S1-19.
252. Hansmann L, Schmidl C, Kett J, Steger L, Andreessen R, Hoffmann P, et al. Dominant Th2 differentiation of human regulatory T cells upon loss of FOXP3 expression. *J Immunol.* 2012;188(3):1275-82. Epub 2012/01/03.
253. Sackstein R. The lymphocyte homing receptors: gatekeepers of the multistep paradigm. *Curr Opin Hematol.* 2005;12(6):444-50.
254. Zhao LC, Edgar JB, Dailey MO. Characterization of the rapid proteolytic shedding of murine L-selectin. *Dev Immunol.* 2001;8(3-4):267-77.
255. Fu S, Yopp AC, Mao X, Chen D, Zhang N, Mao M, et al. CD4⁺ CD25⁺ CD62⁺ T-regulatory cell subset has optimal suppressive and proliferative potential. *Am J Transplant.* 2004;4(1):65-78.
256. Hiura T, Kagamu H, Miura S, Ishida A, Tanaka H, Tanaka J, et al. Both regulatory T cells and antitumor effector T cells are primed in the same draining lymph nodes during tumor progression. *J Immunol.* 2005;175(8):5058-66.
257. Huehn J, Siegmund K, Lehmann JCU, Siewert C, Haubold U, Feuerer M, et al. Developmental stage, phenotype, and migration distinguish naive- and effector/memory-like CD4⁺ regulatory T cells. *J Exp Med.* 2004;199(3):303-13.
258. Lee JH, Kang SG, Kim CH. FoxP3⁺ T cells undergo conventional first switch to lymphoid tissue homing receptors in thymus but accelerated second switch to nonlymphoid tissue homing receptors in secondary lymphoid tissues. *J Immunol.* 2007;178(1):301-11.

259. Smigiel KS, Richards E, Srivastava S, Thomas KR, Dudda JC, Klonowski KD, et al. CCR7 provides localized access to IL-2 and defines homeostatically distinct regulatory T cell subsets. *J Exp Med*. 2014;211(1):121-36.
260. Steeber DA, Green NE, Sato S, Tedder TF. Lymphocyte migration in L-selectin-deficient mice. Altered subset migration and aging of the immune system. *J Immunol*. 1996;157(3):1096-106.
261. Tedder TF, Steeber DA, Chen A, Engel P. The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J*. 1995;9(10):866-73.
262. Petrovic A, Alpdogan O, Willis LM, Eng JM, Greenberg AS, Kappel BJ, et al. LPAM (alpha 4 beta 7 integrin) is an important homing integrin on alloreactive T cells in the development of intestinal graft-versus-host disease. *Blood*. 2004;103(4):1542-7.
263. Tanaka T, Ohtsuka Y, Yagita H, Shiratori Y, Omata M, Okumura K. Involvement of alpha 1 and alpha 4 integrins in gut mucosal injury of graft-versus-host disease. *Int Immunol*. 1995;7(8):1183-9.
264. Li B, New JY, Yap EH, Lu J, Chan SH, Hu H. Blocking L-selectin and alpha4-integrin changes donor cell homing pattern and ameliorates murine acute graft versus host disease. *Eur J Immunol*. 2001;31(2):617-24.
265. Samaan MA, Pavlidis P, Johnston E, Warner B, Digby-Bell J, Koumoutsos I, et al. Vedolizumab: early experience and medium-term outcomes from two UK tertiary IBD centres. *Frontline gastroenterology*. 2017;8(3):196-202. Epub 2017/08/26.
266. Johansson-Lindbom B, Agace WW. Generation of gut homing T cells and their localization to the small intestinal mucosa. *Immunol Rev*. 2007;215(1):226-42.
267. Zhao D, Zhang C, Yi T, Lin CL, Todorov I, Kandeel F, et al. In vivo-activated CD103+CD4+ regulatory T cells ameliorate ongoing chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2008;112(5):2129-38.
268. Braun A, Dewert N, Brunnert F, Schnabel V, Hardenberg J-H, Richter B, et al. Integrin α E(CD103) Is Involved in Regulatory T-Cell Function in Allergic Contact Hypersensitivity. *J Invest Dermatol*. 2015;135(12):2982-91.
269. Komano H, Fujiura Y, Kawaguchi M, Matsumoto S, Hashimoto Y, Obana S, et al. Homeostatic regulation of intestinal epithelia by intraepithelial gamma delta T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(13):6147-51.
270. Guy-Grand D, DiSanto JP, Henchoz P, Malassis-Seris M, Vassalli P. Small bowel enteropathy: role of intraepithelial lymphocytes and of cytokines (IL-12, IFN-gamma, TNF) in the induction of epithelial cell death and renewal. *Eur J Immunol*. 1998;28(2):730-44.
271. Boismenu R, Havran WL. Modulation of epithelial cell growth by intraepithelial gamma delta T cells. *Science*. 1994;266(5188):1253-5.
272. Ismail AS, Behrendt CL, Hooper LV. Reciprocal interactions between commensal bacteria and gamma delta intraepithelial lymphocytes during mucosal injury. *J Immunol*. 2009;182(5):3047-54.

273. Roberts SJ, Smith AL, West AB, Wen L, Findly RC, Owen MJ, et al. T-cell alpha beta + and gamma delta + deficient mice display abnormal but distinct phenotypes toward a natural, widespread infection of the intestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(21):11774-9.
274. Chen Y, Chou K, Fuchs E, Havran WL, Boismenu R. Protection of the intestinal mucosa by intraepithelial gamma delta T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(22):14338-43.
275. Neutra MR, Mantis NJ, Kraehenbuhl JP. Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. *Nat Immunol*. 2001;2(11):1004-9.
276. Sato T, van Es JH, Snippert HJ, Stange DE, Vries RG, van den Born M, et al. Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature*. 2011;469(7330):415-8.
277. Ganz T, Selsted ME, Lehrer RI. Defensins. *Eur J Haematol*. 1990;44(1):1-8.
278. Selsted ME, Harwig SS. Determination of the disulfide array in the human defensin HNP-2. A covalently cyclized peptide. *J Biol Chem*. 1989;264(7):4003-7.
279. Salzman NH, Hung K, Haribhai D, Chu H, Karlsson-Sjoberg J, Amir E, et al. Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology. *Nat Immunol*. 2010;11(1):76-83.
280. Chen Z, Benoist C, Mathis D. How defects in central tolerance impinge on a deficiency in regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(41):14735-40.
281. Fujioka T, Tamaki H, Ikegame K, Yoshihara S, Taniguchi K, Kaida K, et al. Frequency of CD4(+)FOXP3(+) regulatory T-cells at early stages after HLA-mismatched allogeneic hematopoietic SCT predicts the incidence of acute GVHD. *Bone Marrow Transplant*. 2013;48(6):859-64.
282. Edinger M, Cao YA, Hornig YS, Jenkins DE, Verneris MR, Bachmann MH, et al. Advancing animal models of neoplasia through in vivo bioluminescence imaging. *Eur J Cancer*. 2002;38(16):2128-36. Epub 2002/10/22.
283. Fujisaki J, Wu J, Carlson AL, Silberstein L, Putheti P, Larocca R, et al. In vivo imaging of Treg cells providing immune privilege to the haematopoietic stem-cell niche. *Nature*. 2011;474(7350):216-9. Epub 2011/06/10.
284. Hauri-Hohl MM, Keller MP, Gill J, Hafen K, Pachlatko E, Boulay T, et al. Donor T-cell alloreactivity against host thymic epithelium limits T-cell development after bone marrow transplantation. *Blood*. 2007;109(9):4080-8. Epub 2007/01/11.
285. Ramadan A, Paczesny S. Various forms of tissue damage and danger signals following hematopoietic stem-cell transplantation. *Front Immunol*. 2015;6:14. Epub 2015/02/13.
286. Riether C, Schurch CM, Ochsenbein AF. Regulation of hematopoietic and leukemic stem cells by the immune system. *Cell death and differentiation*. 2015;22(2):187-98. Epub 2014/07/06.
287. Ramirez J, Lukin K, Hagman J. From hematopoietic progenitors to B cells: mechanisms of lineage restriction and commitment. *Curr Opin Immunol*. 2010;22(2):177-84. Epub 2010/03/09.

288. Schwab L, Goroncy L, Palaniyandi S, Gautam S, Triantafyllopoulou A, Mocsai A, et al. Neutrophil granulocytes recruited upon translocation of intestinal bacteria enhance graft-versus-host disease via tissue damage. *Nat Med.* 2014;20(6):648-54.
289. Mottet C, Uhlig HH, Powrie F. Cutting edge: cure of colitis by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol.* 2003;170(8):3939-43.
290. Uhlig HH, Coombes J, Mottet C, Izcue A, Thompson C, Fanger A, et al. Characterization of Foxp3+CD4+CD25+ and IL-10-secreting CD4+CD25+ T cells during cure of colitis. *J Immunol.* 2006;177(9):5852-60.
291. Delacher M, Imbusch CD, Weichenhan D, Breiling A, Hotz-Wagenblatt A, Trager U, et al. Genome-wide DNA-methylation landscape defines specialization of regulatory T cells in tissues. *Nat Immunol.* 2017. Epub 2017/08/08.

9 Danksagung

Für die Fertigstellung solch einer Arbeit bedarf es den unterschiedlichsten Voraussetzungen: Begeisterung für die Wissenschaft, einen Anspruch, die erhobenen Daten immer wieder kritisch zu prüfen, Ausdauer, aber auch die Fähigkeit, Rückschläge einstecken zu können. Wirklich möglich wird dies jedoch erst durch die Unterstützung einer Vielzahl von Menschen, denen diese Danksagung gewidmet ist.

Mein besonderer Dank geht an Prof. Dr. Matthias Edinger und PD Dr. Petra Hoffmann für das in mich gesetzte Vertrauen zur Bearbeitung dieses spannenden Themas, die Betreuung, die immer wieder aufs neue den Horizont erweiternden Diskussionen, aber vor allem für die Unterstützung, nicht zuletzt hinsichtlich der Teilnahme an diversen, auch internationalen Kongressen. Herzlichen Dank auch an meine Mentoren: Prof. Dr. Uwe Ritter und Prof. Dr. Thomas Winkler für die wegweisenden Diskussionen sowie an Prof. Dr. Reinhard Andreesen und Prof. Dr. Wolfgang Herr für die stets positive und angenehme Arbeitsatmosphäre in der Inneren Med III.

Ein herzlicher Dank geht an Elisabeth Huber, die freundlicherweise die Bewertung der histologischen Schnitte übernommen hat und immer für etwaige Rückfragen bereitstand. Darüber hinaus danke ich Tina Böld, für die Etablierung der haploidenten KMT und für die Bereitstellung der Vorarbeiten zur Treg-Therapie.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei der Laborclique der AG-Edi/Hoff bedanken: Eveline Röseler, unsere RNA-Queen, für die Isolation und Analyse der mRNA-Daten; Claudia Weber, unsere Histo-Queen, für die Paraffinschnitte und H/E-Färbungen; Rüdiger Eder, Monique Germerodt, Jaqueline Dirmeier und Irina Fink, das Sorter-Team, für das (beinahe) wöchentliche FACS-Sortieren und ganz besonders Elena Vollmer, Anja Stelzl und Isabel Zimmermann, ohne deren tatkräftige Unterstützung die Arbeitsmassen nicht zu bewältigen gewesen wären. Ein großer Dank geht auch an Kristina Doser, die mir bei Nachfragen immer zur Seite stand – ungeachtet dessen wie groß ihre eigene Arbeitsbelastung war. Darüber hinaus danke ich nochmal im Speziellen dem fantastischen Aufarbeitungsteam, Jacky, Evi und Isi, denn große Tage können nur mit den besten Menschen bewältigt werden.

Meinen Freunden, die ich hier in Regensburg finden durfte sowie den langjährigen Freunden danke ich für ihre offenen Ohren, wenn ich mal wieder jemanden zum Reden brauchte und für die abendlichen Ablenkungen, die das Leben erst lebenswert machen. Danke Ute für die Unterstützung und das offene Ohr in den unmöglichsten Lebenslagen sowie die philosophischen Diskussion zum Sinn des Lebens, danke Anna, Steffi und Evi für die schönen Sushi-Abende, danke Isi für die vielen Situationen, in denen wir gleichzeitig lachen, weil wir uns so

wahnsinnig ähnlich sind, danke Sarah fürs Zuhören, auf neue Gedanken bringen und die Rettungsabende, wenn es mal wieder gar nicht mehr ging, danke Nadine für das Korrekturlesen dieser Arbeit, aber noch viel mehr fürs immer für mich da sein, mir in den richtigen Momenten den Kopf zu waschen und das jahrelange morgendliche Skypen im Zug.

Danke an Hemmi und Celia, die das Schreiben und die Korrektur dieser Arbeit durch ihre liebevolle Betreuung verschönert haben.

Ein riesiger Dank von Herzen an Björn. Danke für deine Geduld, danke fürs Zuhören und Teilen meiner Sorgen, danke dafür, dass du mich immer zum Lachen bringst, vor allem wenn mir nicht danach ist, danke fürs herrlich bekloppt sein und danke, dass du immer für mich da bist. Du hast mich gerettet.

Nicht zuletzt gilt mein allerherzlichster Dank meiner Familie, die mich immer, aber vor allem in schwierigen Zeiten bedingungslos unterstützt. Ohne euch hätte ich es nicht geschafft.

10 Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name	Riegel
Vorname	Christin
Geburtsdatum	16.01.1985
Geburtsort	Göppingen

BERUFLICHER WERDEGANG

Ab 09/2011	Universitätsklinikum Regensburg Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Bereich Innere Medizin III AG Prof. Dr. Matthias Edinger - Doktorarbeit mit dem Thema: <i>Therapeutischer Effekt regulatorischer T-Zellen des Spenders in der Graft-versus-Host Erkrankung nach allogener Stammzelltransplantation</i>
------------	---

08/2009 – 08/2011	Universität Tübingen Hilfswissenschaftlerin im Bereich Neuropharmakologie AG Prof. Dr. Werner Schmidt
-------------------	---

AUSBILDUNG

10/2005 – 08/2011	Universität Tübingen Studium der Biologie - Abschluss: Diplom - Diplomarbeit mit dem Thema: <i>Wirkung von MDFPPA in Verhaltens- und Mikrodialyse- Experimenten im 6-OHDA-Hemiparkinson- Modell der Ratte</i> - Schwerpunkte: Tierphysiologie , Pharmakologie, Immunologie
10/2004 – 05/2005	Universität Tübingen Studium der Erziehungswissenschaften

08/1995 – 06/2004 **Hohenstaufen-Gymnasium Göppingen**
Allgemeine Hochschulreife

PUBLIKATIONEN UND KONGRESSE

- 10/2017 **Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie**
Stuttgart
- Vortrag
Effective treatment of severe acute gastrointestinal graft-versus-host disease by in vitro expanded donor regulatory T cells
- 09/2017 **Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie**
Erlangen
- Vortrag
Effective Treg therapy of severe acute gastrointestinal graft-versus-host disease
- 03/2017 **Cellular Therapy**
Erlangen
- Posterbeitrag
Regulatory T cell therapy of acute GVHD after allogeneic BMT
- 06/2016 **German Meeting on Immune Regulation**
Schmöckwitz
- Vortrag
Regulatory T cell therapy of acute GVHD after allogeneic BMT
- 03/2015 **Cellular Therapy**
Erlangen
- Posterbeitrag
Therapeutic effect of donor Treg in GVHD
- 06/2015 **German Meeting on Immune Regulation**
Schmöckwitz
- Vortrag
Therapeutic effect of donor regulatory T cells in aGVHD

- 06/2014 **German Meeting on Immune Regulation**
Schmöckwitz
- Vortrag
*Impact of donor-derived CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells
on graft-versus-host disease of the gastrointestinal tract*
- 03/2013 **Cellular Therapy**
Erlangen
- Posterbeitrag
*Impact of donor-derived CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells
on graft-versus-host disease of the gastrointestinal tract*
- 04/2012 **Microbiota, Probiota and Host**
Seeon
- Posterbeitrag
*Impact of donor-derived CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells
on graft-versus-host disease of the gastrointestinal tract*